

Č E S K O S L O V E N S K Á A K A D E M I E V Ě D

Č E S K O S L O V E N S K Á
M I K R O B I O L O G I E

ROČNÍK

2

ČÍSLO

2



ČS. MIKROBIOL.

PRAHA, DUBEN 1957 · STR. 65—128

Č E S K O S L O V E N S K Á M I K R O B I O L O G I E

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

O B S A H

Rokos J., Burger M. a Procházka P.: Vliv chlortetracyklinu na činnost α -amylázy produkčního kmene <i>Actinomyces aureofaciens</i>	65
Knedlhansová E.: Experimentální příspěvek ke vzniku křížové resistance u stafylokoků (<i>Micrococcus pyogenes</i>)	71
Vinter V.: Sporulace bacilů. IV. Ovlivnění tvorby spor <i>Bacillus megatherium</i> cysteinem a cystinem	80
Johanovský J.: Význam shlukovacího faktoru pro choroboplodnost stafylokoků	90
Šterzl J.: Přenos tvorby protilátek buňkami polymorfonukleárního exsudátu	96
Holub M.: Imunologické a histologické změny při imunisaci lipidním adjuvans	103
Drobník J.: Použití respirometrie v půdní mikrobiologii. I. Metodika makrorespirometrie	116
<i>Recenze</i>	124
<i>Zprávy</i>	127

Československá
M I K R O B I O L O G I E

ročník 2. (1957) - č. 2

Vliv chlortetracyklinu na činnost α -amylázy produkčního kmene
Actinomyces aureofaciens

JOSEF ROKOS, MIKULÁŠ BURGER a PAVEL PROCHÁZKA

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 23. 10. 1956

V předešlé práci jsme zjistili inhibiční vliv chlortetracyklinu na α -amylázu plísňe *Aspergillus oryzae* (Burger, Rokos a Procházka 1956). Vypracovali jsme jednoduchou metodu, kterou je možno tuto inhibici odstranit a měřit aktuální koncentraci α -amylázy v substrátu, kde je přítomen chlortetracyklin.

V této práci jsme studovali, zda inhibiční účinek chlortetracyklinu na činnost α -amylázy se projevuje také u α -amylázy z jiných biologických zdrojů, při čemž jsme se soustředili především na to, zda dochází k inhibici α -amylázy produkčního kmene *Actinomyces aureofaciens* při fermentační přípravě chlortetracyklinu. Proto jsme sledovali průběh aktivity α -amylázy během kultivace kmene produkujícího chlortetracyklin a stupeň inhibice aktivity α -amylázy tímto antibiotikem. Dále jsme studovali vliv chlortetracyklinu na aktivitu pankreatické α -amylázy.

Materiál a metody

Analytické metody. Analytické metody byly popsány v předešlé práci (Burger, Rokos a Procházka 1956). Jedna jednotka pankreatické α -amylázy odpovídá takovému množství enzymu v 1 ml roztoku, které zextrinuje 1 g škrobu za jednu hodinu. U α -amylázy produkčního kmene je jedna jednotka 1000 \times menší, protože je vztahována na 1 mg zextrinovaného škrobu. Aktivita je vztahována na 1 ml původního roztoku enzymatického preparátu. U *Actinomyces aureofaciens* je to 1 ml filtrátu kultivační tekutiny a u pankreatické α -amylázy je to 1 ml základního roztoku enzymu, získaného přečištěním pankreatického extraktu.

Pracovní postup. Pankreatickou α -amylázu jsme připravili podle Meyera, Fischera a Bernfelda (1947) do druhého stupně přečištění. Inkubační roztoky pankreatické α -amylázy byly regulovány fosfátovým pufrům o konečné koncentraci $7,5 \cdot 10^{-2}$ M a obsahovaly 0,1 % NaCl; pH roztoku bylo udržováno při 6,5.

Kultivační podmínky produkčního kmene *A. aureofaciens* jsme popsali dříve (Rokos, Řiřica a Procházka 1955). Roztok α -amylázy z *A. aureofaciens* jsme získali odfiltrováním kultury. Inkubační směsi obsahovaly fosfátový pufr o konečné koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2}$ M.

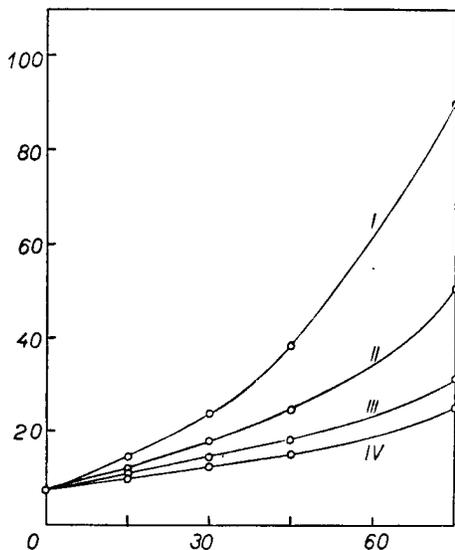
Ve všech pokusech jsme konstantně udržovali pH 6,0. Množství použitých enzymů v inkubačních směsích jsme volili tak, aby dextrinace škrobu proběhla asi za 60 minut. Jinak se pracovní postup nelišil od uvedeného v předešlé práci (Burger, Rokos a Procházka 1956).

Výsledky

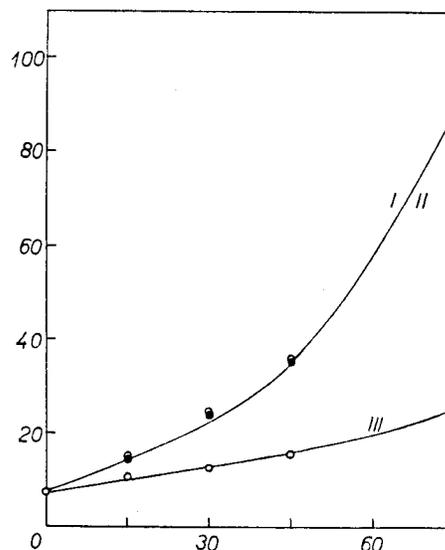
Vliv chlortetracyklinu na pankreatickou α -amylázu

Chlortetracyklin brzdí činnost pankreatické α -amylázy obdobně jako činnost α -amylázy plísňe *Aspergillus oryzae*. Obrázek 1 ukazuje průběh světelné propustnosti

jodoškrobového komplexu při hydrolyse škrobu α -amylásou z pankreatu za přítomnosti a nepřítomnosti chlortetracyklinu. Aktivita pankreatické α -amylázy za nepřítomnosti chlortetracyklinu byla 222 jednotek. Za přítomnosti 1000 μg chlortetracyklinu v 1 ml roztoku byla 60 jednotek.



Obr. 1. Vliv koncentrací chlortetracyklinu na inhibici pankreatické α -amylázy. Osa x: čas v min., osa y: propustnost v %; I - kontrola, II - 600 μg , III - 800 μg , IV - 1000 μg chlortetracyklinu v 1 ml.



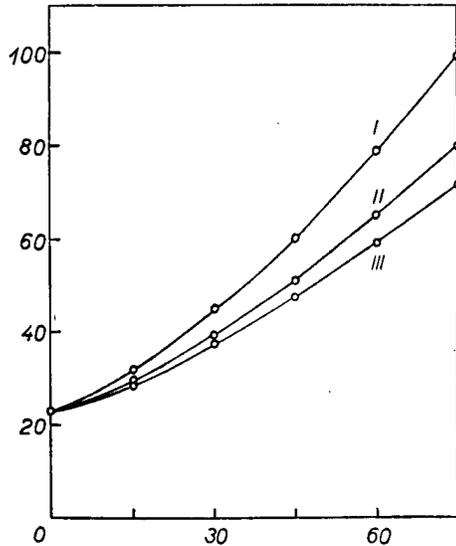
Obr. 2. Vliv citrátu na inhibici pankreatické α -amylázy chlortetracyklinem. Osa x: čas v min., osa y: propustnost v %. Konečná koncentrace Na-citrátu $2 \cdot 10^{-2}$ M; I - kontrola, II - 1000 μg chlortetracyklinu a Na-citrát, III - 1000 μg chlortetracyklinu v 1 ml.

V předešlé práci jsme dokázali, že je možno odstranit citrátem a jinými anionty organických kyselin inhibici vyvolanou chlortetracyklinem. Zkoušeli jsme i u tohoto amylytického systému, zda citrát bude mít stejný vliv. Obrázek 2 ukazuje, že přítomnost citrátu ve stejné koncentraci, jaké jsme použili v první práci, odstraňuje inhibiční účinek chlortetracyklinu. Inhibiční účinek chlortetracyklinu na pankreatickou α -amylázu se tedy projevuje stejně jako na α -amylázu z *Aspergillus oryzae*.

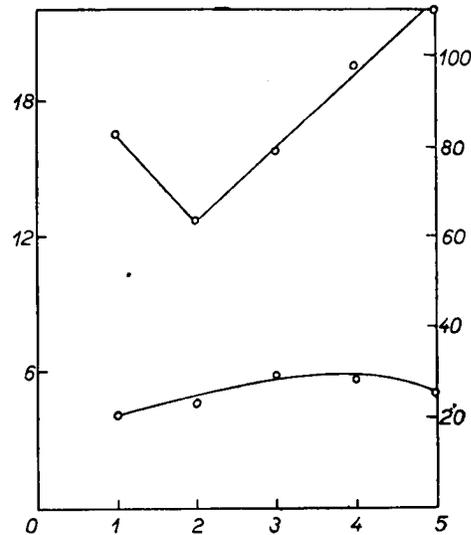
Vliv chlortetracyklinu na aktivitu α -amylázy produkčního kmene *Actinomyces aureofaciens*

Z prací několika autorů (Bois a Savary 1945, Waksman 1950) je známo, že řada aktinomycet produkuje α -amylázu. Simpson a Mc Coy (1953) studovali u pěti druhů aktinomycet produkci α -amylázy. Tito autoři zjistili, že škrob v substrátu je hydrolyzován pouze α -amylásou, při čemž maltáza nebyla přítomna. U produkčního kmene *Actinomyces aureofaciens* však nebyla produkce α -amylázy sledována. U tohoto kmene jsme rovněž zjistili přítomnost α -amylázy v substrátu, nezjistili jsme však maltázu. Naše předcházející pokusy ukázaly, že v tomto případě je nutno počítat s inhibicí α -amylázy chlortetracyklinem. Proto dříve, než jsme sledovali průběh aktivity α -amylázy během kultivace *A. aureofaciens*, zjišťovali jsme, jak ovlivňuje aktivitu další přídavek chlortetracyklinu do roztoku a dále, zda případnou inhibici lze odstranit kyselinou citronovou.

K filtrátu fermentační tekutiny ze 72. hodiny kultivace jsme přidali 1000 μg chlortetracyklinu na 1 ml konečného objemu substrátu a zjišťovali jsme stupeň inhibice. V souběžném pokuse jsme navíc přidali kyselinu citronovou. Obrázek 3 ukazuje, že chlortetracyklin při stejné koncentraci inhiboval mnohem méně α -amyl-



Obr. 3. Vliv chlortetracyklinu na činnost α -amylázy *Actinomyces aureofaciens* a vliv citrátu na inhibici této α -amylázy chlortetracyklinem. Osa x: čas v min., osa y: propustnost v %. Konečná koncentrace Na-citrátu $2 \cdot 10^{-2}$ M; I – kontrola, II – 1000 μg chlortetracyklinu a Na-citrát, III – 1000 μg chlortetracyklinu na 1 ml.



Obr. 4. Průběh aktivity α -amylázy *Actinomyces aureofaciens* a inhibice chlortetracyklinem během kultivace. Osa x: dny fermentace, aktivita a inhibice stanovena ve 24hod. intervalech, osa y_0 : jednotky α -amylasové aktivity, osa y_1 : inhibice α -amylázy chlortetracyklinem v % snížení aktivity vzhledem ke kontrole; nahoře – průběh aktivity α -amylázy, dole – průběh míry inhibice α -amylázy *Actinomyces aureofaciens* během kultivace.

lásu produkčního kmene *A. aureofaciens*, než tomu bylo u α -amylázy *A. oryzae* a pankreatické. Chlortetracyklin snižoval v tomto případě aktivitu pouze o 26 %. Také přidavek kyseliny citronové měl jen nepatrný vliv.

Tab. 1. Průběh aktivity α -amylázy *Actinomyces aureofaciens* během fermentace, inhibice α -amylázy chlortetracyklinem a odstranění inhibice α -amylázy kyselinou citronovou.

Hodina fermentace	Produkce chlortetracyklinu v μg	Přidavky		
		0 kontrola	chlortetracyklin	chlortetracyklin + kyselina citronová
24	—	16,6	13,2	13,1
48	1210	12,7	9,7	9,7
72	1430	15,8	11,6	13,1
96	1030	19,5	13,9	16,0
120	—	22,1	16,4	17,3

Konečná koncentrace přidaného chlortetracyklinu $2 \cdot 10^{-3}$ M, konečná koncentrace citrátu sodného $2 \cdot 10^{-2}$ M. Vyjádřeno v α -amylolytických jednotkách.

Tyto výsledky dokazují, že α -amyláza kmene *A. aureofaciens* při produkci chlortetracyklinu se podstatně liší od α -amylázy plísňové a pankreatické vzhledem k inhibici chlortetracyklinem.

Průběh aktivity α -amylázy produkčního kmene *A. aureofaciens* při hloubkové fermentaci chlortetracyklinu na třepacím stroji je uveden na obrázku 4 a v tabulce 1. Obrázek 4 ukazuje, že přídavek 1000 μg chlortetracyklinu k filtrátu kultury snižoval aktivitu v průměru o 25 %.

Diskuse

Je známo (Waksman 1950), že při kultivaci aktinomycet na škrobnatém substrátě se hromadí v mediu α -amyláza. Blíže studovali druh amylolytických fermentů u několika aktinomycet Simpson a Mc Coy (1953). Zjistili, že tyto kmeny produkovaly typickou α -amylázu, nikoliv však maltázu. U produkčního kmene *Actinomyces aureofaciens* jsme v substrátě zjistili rovněž samotnou α -amylázu bez maltázy. Průběh aktivity tohoto enzymu během fermentace chlortetracyklinu uvádíme v experimentální části práce.

Na rozdíl od studia amylás neprodukčních kmenů vznikla u produkčního kmene otázka, zda v substrátě nahromaděný chlortetracyklin neovlivní aktivitu α -amylázy. Tato možnost se zdála být pravděpodobná, uvážíme-li, že na α -amylázu z jiných zdrojů, jako z plísně *A. oryzae* a pankreatickou, projevoval chlortetracyklin inhibiční vliv v koncentracích od 400 μg v 1 ml výše. Metodou odstranění inhibice (kyseliny, dialýsou) jsme zjistili, že chlortetracyklin má při velmi vysokých koncentracích (1400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) jen velmi malý vliv na aktivitu α -amylázy produkčního kmene.

Je tedy α -amyláza produkčního kmene zcela odlišná od α -amylás plísně *A. oryzae* a pankreatické ve vztahu k chlortetracyklinu. Tato okolnost je zajímavá, uvážíme-li, že mechanismus štěpení škrobu α -amylásami různých zdrojů je v zásadě stejný (Myrbäck a Neumuller 1951). Je však známo, že v několika směrech se α -amylázy z různých zdrojů přece jen liší (na př. optimální pH a teplota, vztah dextrinace a sacharisace, afinita k různě dlouhým řetězcům substrátu a pod.). Některé vlastnosti α -amylás jsou proměnlivé a závisí na kultivačních podmínkách. Campbell (1955) zjistil, že α -amylázy jedné fakultativně termofilní bakterie se lišily při kultivaci za různých teplot pouze v resistenci vůči vyšším teplotám. Isolovaná a přečištěná α -amyláza po kultivaci při 55 °C byla resistantní vůči teplotě 90 °C, po kultivaci při 30 °C (jinak za stejných podmínek) však α -amyláza tuto resistenci ztrácela. Je velmi pravděpodobné, že i v našem případě je odolnost α -amylázy vůči chlortetracyklinu dána adaptivní přeměnou α -amylázy vlivem chlortetracyklinu v prostředí. Bude tedy závažné zjistit, zda α -amyláza neprodukčního kmene bude v této souvislosti stejného charakteru jako α -amyláza kmene produkčního.

Bylo zjištěno, že v rané fázi kultivace produkčního kmene je ovlivněn celkový metabolismus kmene, je-li přidán chlortetracyklin v určité koncentraci (Boretti a Raggi 1955). Chlortetracyklin ovlivňuje v této fázi metabolismus v několika směrech. Bude zajímavé zjistit, zda v této fázi nedochází vlivem chlortetracyklinu k adaptivním jevům některých enzymatických systémů. Naše práce poukazuje na to, že k podobnému účinku by mohlo docházet u α -amylázy produkčního kmene. Přímou odpověď na tuto otázku však očekáváme ze srovnání vlivu chlortetracyklinu na α -amylázu produkčního a neprodukčního kmene *A. aureofaciens*. Toto bude řešit naše příští práce.

Naše výsledky dokazují, že při produkci chlortetracyklinu nedochází k inaktivaci enzymatického systému štěpícího škrob a tedy v tomto směru jsou dány podmínky, aby veškerý uhlohydrátový substrát (též škrob) byl během fermentace využit.

Je známo, že při léčbě chlortetracyklinem vznikají zažívací potíže (Mc Lean 1951, Kleitsch 1951, Leland a sp. 1951, Müller a sp. 1952, Siegel 1952). Lze předpokládat, že tyto potíže jsou způsobeny komplexním účinkem chlortetracyklinu. Skutečnost, že jsme našli v pokusech in vitro silný inhibiční vliv chlortetracyklinu na pankreatickou α -amylázu, který se dal odstranit citrátem, bude nám pobídkou k tomu, abychom podrobněji prošetřili otázku, zda potíže nejsou alespoň částečně vyvolány inhibicí trávicích enzymů v zažívacím traktu a zda nelze tyto potíže odstranit nebo alespoň zmírnit.

Souhrn

Prokázali jsme inhibiční vliv chlortetracyklinu na dextrinační činnost pankreatické α -amylázy. Tato inhibice je reversibilní a lze ji odstranit anionty organických kyselin. Naproti tomu jsme zjistili, že chlortetracyklin má při vysokých koncentracích (1400 $\mu\text{g/ml}$) jen nepatrný vliv na aktivitu α -amylázy produkčního kmene *A. aureofaciens*. Tato amyláza je tedy zcela odlišná od α -amylázy plísňe *A. oryzae* a pankreatické ve vztahu k chlortetracyklinu. Byl studován průběh aktivity α -amylázy během fermentace chlortetracyklinu produkčním kmenem *A. aureofaciens*.

Literatura

- 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.: *Vliv chlortetracyklinu na aktivitu α -amylázy*. Čs. mikrobiologie 1 : 105, 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.
- Mc Lean, 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' α -amylase de pancreas*. Helv. Chim. Acta, 30 : 64, 1947.
- Müller, R., Vogl, H.: *Nebenwirkungen von Aureomycin, Chloromycetin und Terramycin*. Ref. Ars. Med., 42 : 179, 1952.
- Myrbäck, K., Neumuller, G.: *Ergebnisse der Enzymforschung*. Band XII, Leipzig 1951.
- Rokos, J., Řiřica, J., Procházka, P.: *Studium produkce chlortetracyklinu u Actinomyces aureofaciens. I*. Čs. biologie, 4 : 333, 1955.
- 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., Mc Coy, E.: *The amylases of five Streptomyces*. Appl. Microb., 1 : 228, 1953.
- Waksman, S. A.: *The Actinomycetes*. Waltham 1950.

Влияние хлортетрациклина на активность α -амилазы производственного штамма *Actinomyces aureofaciens*

И. Рокос, М. Бургер и П. Прохазка

Р е з ю м е

Мы доказали существование подавляющего действия хлортетрациклина на декстринизирующую активность α -амилазы панкреатической железы. Это подавление оказывается обратимым: его можно устранить с помощью анионов органических кислот. С другой стороны, мы установили, что хлортетрациклин и при высоких концентрациях (1400 $\mu\text{г}/\text{мл}$) оказывает лишь незначительное влияние на активность α -амилазы производственного штамма *Actinomyces aureofaciens*. Итак, по отношению к хлортетрациклину эта амилаза ведет себя совсем иначе, чем α -амилаза грибка *A. oryzae* или панкреатической железы. Нами изучалась динамика активности α -амилазы в течение ферментации хлортетрациклина производственным штаммом *Actinomyces aureofaciens*.

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

J. Rokos, M. Burger, P. Procházka

S u m m a r y

The inhibitory influence of chlortetracycline on the dextrination activity of pancreatic α -amylase was demonstrated. This inhibition is reversible and can be removed by the anions of organic acids. On the other hand it was found that chlortetracycline in high concentrations (1.400 $\mu\text{g}/\text{ml}$.) only very slightly influences the activity of the α -amylase of the production strain, *Actinomyces aureofaciens*. This amylase, therefore, is entirely different from the α -amylase of the fungus *Aspergillus oryzae* and from pancreatic α -amylase in relation to chlortetracycline. The course of the activity of α -amylase during fermentation of chlortetracycline by the production strain *Actinomyces aureofaciens* was studied.

Československá

M I K R O B I O L O G I E

ročník 2. (1957) — č. 2

Experimentální příspěvek ke vzniku křížové resistance u stafylokoků (*Micrococcus pyogenes*)

EMILIE KNEDLHANSOVÁ

Ústav pro péči o matku a dítě, Praha-Podolí

Ředitel ústavu prof. Dr J. Trapl

Došlo 22. 9. 1956

V poslední době je všeobecně znám velký vzestup počtu kmenů stafylokoků resistantních vůči antibiotikům. Procento kolísá a závisí na užívání antibiotik.

Vzniku resistance k užitým antibiotikům a různým mechanismům, které ji ovlivňují, je v literatuře věnována velká pozornost. S postupující léčbou antibiotiky pozorují někteří pracovníci současný vzestup počtu kmenů mikroorganismů necitlivých i na antibiotika k léčbě nepoužitá, t. zv. křížovou resistenci. Tento problém nebyl doposud podrobněji prostudován.

Křížová resistance byla pozorována nejčastěji u antibiotik příbuzné struktury. Nejvíce u tetracyklinových (Fussilo a sp. 1951, Gauze 1953, Gocke a sp. 1951, Herell a sp. 1950, Chabbert a sp. 1952, Martin a sp. 1953, Moustardier a sp. 1956, Kaipainen 1951, Levaditi a sp. 1953a, b, Pansy a sp. 1950), u streptomycinu a streptotricinu (Gauze 1953, Nétien a sp. 1952, Sullivan 1951). Mnohem méně byla zjištěna u antibiotik se vzdálenější strukturou. Záleží tu na druhu a kmeni mikroba (Moustardier a sp. 1956, Levaditi a Eveno 1953a, b) a na množství antibiotika, na něž jsou mikroorganismy adaptovány (Klimek 1948). Z různých studovaných mikroorganismů (*B. coli*, *Aerobacter*, *Proteus*, *E. typhosa*, *Ps. aeruginosa*, *Staphylococcus*) měly největší přizpůsobivost stafylokoky. Klimek (1948) zjistil, že stafylokoky adaptované na menší množství penicilinu (pouze do 1 μ g na 1 ml) nezvyšují resistenci na streptomycin, kdežto kmeny adaptované na vyšší množství zvyšují.

Dyková, Tichý a Knedlhansová (1957) pozorovali při dynamickém sledování chronických cervicitid před léčbou, během léčby a po ní, že se před léčbou nacházejí u žen mikroby převážně citlivé, během léčby a po ní opět kmeny převážně resistantní, a to na všechna zkoumaná antibiotika (penicilin, streptomycin, aureomycin, chloramfenikol, penicilin se streptomycinem), ačkoliv ženy byly léčeny jen penicilinem a streptomycinem. U těchto kmenů jsme zatím nemohli prokázat souvislost. Jelikož je tato okolnost velmi závažná, konali jsme pokusy k bližšímu prozkoumání a objasnění tohoto úkazu.

Materiál a metody

K pokusům jsme vybrali 10 kmenů stafylokoků, dobře citlivých na všechna námi zkoušená antibiotika. Přehled o původu a vlastnostech těchto kmenů podává tab. 1.

Zkoušky citlivosti jsme dělali normálně užívanou papírkovou metodou při koncentraci antibiotik: penicilin 10 jednotek, streptomycin 500 μ g, aureomycin 250 μ g a chloramfenikol 250 μ g na 1 ml. Na papírek jsme dávali jednu kapku vždy stejnou pipetou. Při kombinaci penicilinu a streptomycinu jsme dávali kapku penicilinu a kapku streptomycinu na jeden papírový kotouček.

Tyto citlivé kmeny jsme adaptovali na antibiotika v pěti seriích pokusů: v první serii jsme kmeny adaptovali na penicilin, v druhé na streptomycin, v třetí na aureomycin, ve čtvrté na chloramfenikol a v páté na kombinaci penicilinu a streptomycinu. Vyšli jsme vždy od původních kmenů a každou serii jsme ukládali do termostatu odděleně, aby nenastalo ovlivnění ostatními antibiotiky. Postupovali jsme takto: na krevní agar jsme nanесли hustými čarami mikroba a na přiložený papírový kotouček jsme pipetovali zkoušené antibiotikum jako při normální zkoušce citlivosti (obr. 1). Za 24 hod. jsme měřili

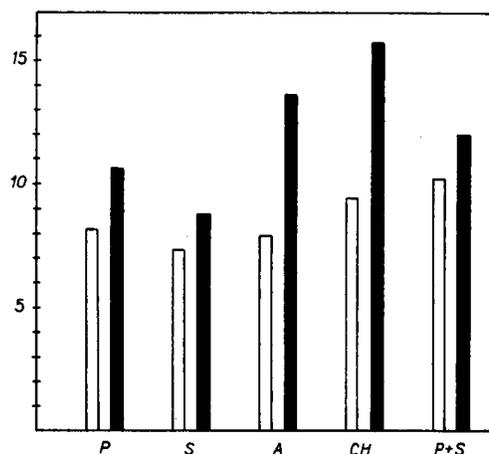
Tab. 1. Původ a některé vlastnosti zkoumaných kmenů stafylokoků

Kmen stafylokoka	Z čeho byl kmen izolován	Vlastnosti kmene		Hyaluronidasa
		haemolysa	plasmakoagulasa	
1	hnis z Barthol. žlázy	+	+	+ 25
2	sekret z oka	+	0	0
3	výtěr z cervixu	+	0	0
4	výtěr z cervixu	+	+	+ 50
5	výtěr z cervixu	+	+	0
6	výtěr z cervixu	+	0	0
7	výtěr z cervixu	+	0	0
8	výtěr z cervixu	+	0	0
9	výtěr z cervixu	+	0	0
10	sekret z oka	+	0	0

Kmeny byly izolovány před zahájením léčby.

inhibiční zonu a sklíčkovou metodou jsme zjistili plasmakoagulasu. Oddělenou zkouškou jsme současně prověřili citlivost na ostatní antibiotika. Mikroby vyrostlé nejbliže papírového kotoučku jsme přenesli na novou misku a adaptaci jsme opakovali. Antibiotika jsme dávali stále stejná množství. Návyk se projevil zmenšováním inhibiční zony. Roztoky penicilinu a streptomycinu jsme připravovali vždy čerstvé, aureomycinu a chloramfenikolu jednou týdně. Kontrolně jsme testovali i původní kmeny. Jejich citlivost na jednotlivá antibiotika se neměnila. Paralelní zkoušky citlivosti byly dělány dvakrát.

V průběhu adaptace se často stávalo, že se kmen jevil jako necitlivý, ale v příští jedné nebo několika pasážích se objevila opět menší inhibiční zóna. Kmeny jsme znečitlivovali, až se nám projevila rezistence beze změny v pěti již uvedených pasážích.



Obr. 1. Průměrná rychlost adaptace deseti kmenů *M. pyogenes* na antibiotika. Osa y: počet pasáží. Vysvětlení značek u tab. 2.

Výsledky

Citlivost všech kmenů stafylokoků, pasážovaných na půdách s jednotlivými antibiotiky, se měnila. Postupně docházelo ke ztrátě citlivosti vůči užitému antibiotiku. Rezistence se často vytvářela kolísavě. Po první adaptaci se stávalo, že se opět v příští nebo několika pasážích objevila ještě určitá citlivost. Inhibiční zóny však byly již menší a po určitém počtu pasáží se kmeny znovu adaptovaly. Počet pasáží potřebných k adaptaci nebo k rezistenci byl různý pro jednotlivá antibiotika, ale kolísal u každého kmene, jak ukazuje tab. 2. Obrázek 1 dává průměrnou hodnotu pro 10 kmenů. Rozptýl v počtu pasáží byl tak veliký, že nemůžeme při

svých 10 kmenech činit konečné závěry o rozdílech mezi jednotlivými užitými antibiotiky. Poměrně nejrychleji nastávala adaptace a resistance vůči streptomycinu (průměrně 7, případně 9 pasáží na kmen). U chloramfenikolu byl největší rozdíl v počtu pasáží, nutných k dosažení adaptace a resistance (9 k dosažení adaptace, 15 k dosažení resistance). Kombinace streptomycinu s penicilinem oddálila poněkud adaptaci i resistenci proti jednotlivým antibiotikům. Současně se ztrátou citlivosti na antibiotikum, na něž jsme kmen adaptovali, nastával vzrůst křížové resistance i vůči ostatním antibiotikům, s nimiž adaptovaný kmen nepřišel do styku.

Tab. 2. Počet pasáží na živné půdě s antibiotikem potřebných k adaptaci a resistenci deseti kmenů stafylokoků

Číslo kmene	Počet pasáží potřebných k adaptaci a resistenci	P	S	A	CH	P + S
1	A	5	9	13	7	14
	R ₁	11	9	13	16	20
2	A	3	11	8	13	12
	R ₁	11	11	14	17	12
3	A	9	6	13	8	5
	R ₁	9	9	18	11	5
4	A	3	1	2	3	3
	R ₁	3	9	2	14	3
5	A	5	6	7	7	8
	R ₁	10	10	18	13	8
6	A	13	10	3	13	10
	R ₁	13	10	13	19	13
7	A	12	5	3	5	6
	R ₁	12	5	13	16	10
8	A	10	9	11	11	11
	R ₁	10	9	20	16	11
9	A	10	10	6	13	10
	R ₁	10	10	13	13	13
10	A	11	7	7	7	13
	R ₁	20	7	13	13	16

A = první adaptace, kmen může být ještě znovu částečně citlivý na užitá antibiotika.
R₁ = počátek resistance (adaptace ustálená v pěti následujících pasážích).
R₅ = pátá pasáž od R₁, pěstovaná stále v antibiotiku.
C = původní citlivost kmene před adaptací na jakékoliv antibiotikum.
P = penicilin, S = streptomycin, A = aureomycin, CH = chloramfenikol, P + S = směs 1 díl penicilinu a 1 díl streptomycinu.

Tabulka 3 zachycuje průběh vývoje křížové resistance vůči různým antibiotikům při adaptaci kmenů na určité antibiotikum. Zkřížená resistance vznikala vůči všem užitým antibiotikům, poměrně nejpomaleji vůči aureomycinu.

U některých kmenů jsme pozorovali změny v pigmentaci. Během adaptace se měnil bílý pigment ve žlutý a také byla ovlivněna tvorba plasmakoagulázy tak, že kmeny, které původně plasmu neaglutinovaly, nabyly této schopnosti.

Tab. 3. Změny citlivosti vůči užitým antibiotikům a křížová rezistence na ostatní zkoumaná antibiotika. Průměr inhibiční zony udán v mm.

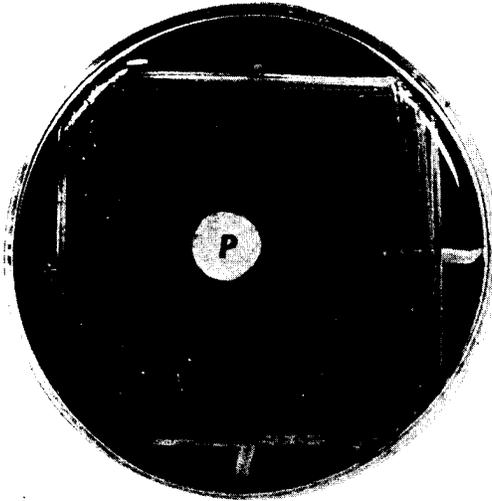
Kmen	Citlivost na	Stupeň adaptace																	
		P			S			A			CH			P + S					
		C	A	R ₁	R ₅														
1	P	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	A	42	15	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	11	20	0	0	
	CH	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	P + S	50	21	0	0	0	0	0	10	12	40	40	21	0	0	0	0	0	
2	P	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	30	22	0	0	0	0	0	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0	
	A	40	21	10	0	0	0	0	30	30	0	0	0	0	0	0	0	0	
	CH	32	20	0	0	0	0	0	20	20	0	0	0	0	11	20	0	0	
	P + S	32	29	0	0	0	0	0	40	40	0	0	11	0	0	0	0	0	
3	P	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	30	0	0	0	0	0	0	30	30	0	0	0	0	0	0	0	0	
	A	32	10	12	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
	CH	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	P + S	40	0	0	0	0	0	0	34	40	0	0	0	0	12	0	0	0	
4	P	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	A	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	CH	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	P + S	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	P	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	51	20	0	0	0	0	0	40	40	30	0	0	0	0	0	0	0	
	A	35	30	30	0	20	0	0	20	21	0	0	21	0	0	0	0	0	
	CH	30	20	0	0	0	0	0	22	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
	P + S	52	31	0	0	0	0	0	40	40	41	0	0	0	0	0	0	0	

Tabulka 3 (pokračování)

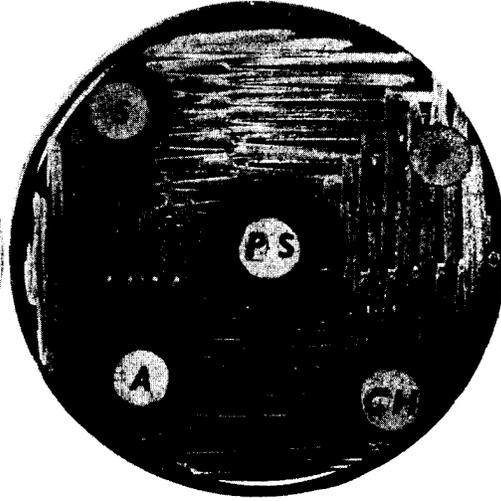
6	P	40	0	0	0	10	10	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	30	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A	30	30	20	20	25	0	20	0	0	0	0	0	0	15	15	15
	CH	30	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P + S	40	30	0	0	10	10	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	P	50	0	0	0	0	0	0	10	10	0	40	0	0	0	0	0
	S	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0
	A	41	0	0	20	0	10	0	0	0	0	11	20	0	10	12	0
	CH	30	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P + S	50	0	0	0	0	0	0	10	10	0	50	10	10	0	0	0
8	P	50	0	0	0	0	0	0	10	40	20	0	0	0	0	0	0
	S	42	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	A	32	15	20	15	20	20	20	0	0	0	20	21	20	24	25	10
	CH	26	0	10	10	0	0	0	15	30	20	0	0	0	0	0	0
	P + S	52	10	0	0	0	0	0	15	30	15	12	0	0	0	0	0
9	P	40	0	0	0	0	0	30	0	0	0	10	0	0	0	0	0
	S	35	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A	30	30	20	20	20	20	10	0	0	0	22	20	20	15	0	0
	CH	34	20	10	10	0	0	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	P + S	41	20	20	20	0	0	40	0	0	0	10	11	0	0	0	0
10	P	41	0	0	0	30	30	0	0	0	20	40	0	0	0	10	0
	S	30	0	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
	A	32	0	30	0	20	0	0	0	0	0	25	25	12	21	22	20
	CH	40	0	30	0	25	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
	P + S	50	0	30	0	40	0	0	0	0	30	40	0	0	0	0	0

Diskuse

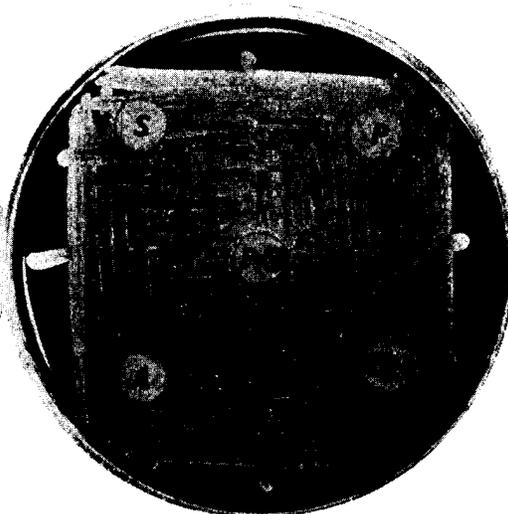
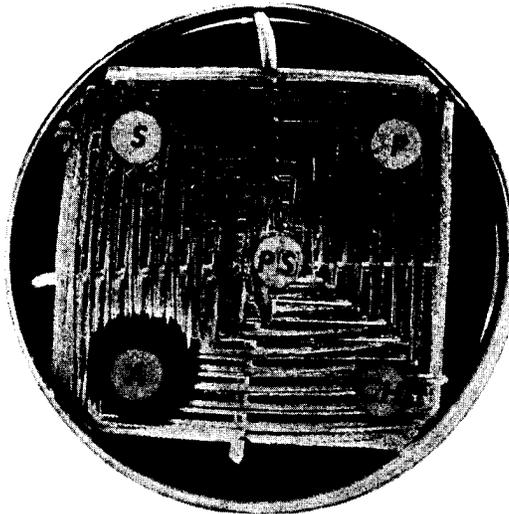
Velmi rychlé přizpůsobení stafylokoků k užitým antibiotikům, kterého jsme dosáhli ve svých pokusech, souhlasí s dosavadními poznatky klinickými i s výsledky četných autorů. Tak na př. Kaipainen (1951) dosáhl znečitlivění různých kmenů sedmi pasá-



Obr. 2. Adaptace na antibiotika.



Obr. 3. Citlivost na ostatní antibiotika při první adaptaci (přechodné resistenci).



Obr. 4 a 5. Resistence vůči ostatním antibiotikům při hlubší adaptaci R_1 .

žemi v antibiotiku, Pansy (1950) pěti až deseti pasážemi. Nami zjištěné počáteční kolísavé vytváření resistance může částečně osvětlit rozdíly mezi výsledkem v laboratoři a klinickou zkušeností. Zachytíme-li populaci převážně citlivou, ale odštěpenou

jen pomnožením primárně necitlivých kmenů, neboť tyto jsou podle dosavadních poznatků nevirulentní (Dubos 1948), nebo reinfekcí jinými necitlivými kmeny téhož mikroba.

Naše pokusy alespoň zčásti vysvětlují tento zjev. Jde zřejmě o přizpůsobení ne zcela specifické. Z klinické zkušenosti, získané u recidivujících onemocnění, kdy pacienti přicházejí po kratší či delší době se stejným mikroblem znovu citlivým, soudíme, že ani v případě resistance přímé ani v případě resistance zkrřížené nejde vždy o resistance trvalou. Pokusy in vitro bude ovšem nutno dokázat, že návrat citlivosti nastává u týchž kmenů mikroba.

Souhrn

U deseti kmenů stafylokoků docházelo k rychlé adaptaci a vzniku resistance vůči penicilinu, streptomycinu, aureomycinu, chloramfenikolu a kombinaci penicilinu a streptomycinu. Částečně adaptované kmeny odštěpovaly ještě kmeny citlivé, tyto opět necitlivé. Téměř souběžně s resistencí vůči antibiotiku, na něž jsme kmeny adaptovali, docházelo k znečitlivění i na ostatní antibiotika ze zkoumané řady. Při vytváření křížové resistance zůstávala nejdéle citlivost vůči aureomycinu. V průběhu adaptace se měnil bílý pigment některých kmenů ve žlutý.

Za technickou spolupráci děkuji L. Jirouškové, J. Kubalové a J. Rottovi.

Literatura

- Barber, M.: *Pigment production by Staphylococci*. J. Gen. Mikrobiol. 13 : 338, 1955.
- Dubos, R.: *Bacterial and mycotic infections of man*. Philadelphia 1948.
- Dyková, H., Tichý, M., Knedlhansová, E.: *Změny v bakteriální flóře v průběhu léčení chronických cervicitid antibiotiky u sterilních žen*. Čs. gynaekologie 1957, v tisku.
- Eagle, H., Fleischmann, R., Levy, M.: *Development of increased bacterial resistance to penicilin, chloramfenicol and streptomycin. Continous spectrum of*. J. Bact. 63 : 623, 1952.
- Fussillo, M., H., Romanovsky, M. J.: *The simultaneous increase in resistance of Bacteria to aureomycin and terramycin upon exposure to either antibiotic*. Antib. Chemother. 1 : 472, 1951.
- Gauze, H. F.: *Lekcijski po antibiotikam*. Moskva 1953.
- Goeke, T. M., Finland, M., Wilcox, C.: *Cross resistance to antibiotics*. J. Lab. Clin. Med. 38 : 719, 1951.
- Herrel, W. E., Heilmann, F. R., Wellman, W. E.: *Some bacteriologic, pharmacologic and clinical observations on terramycin*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 53 : 448, 1950.
- Chabbert, Y., Terrial, G.: *Évolution actuelle des types de résistance aux antibiotiques. Chez les Staphylocoques pathogènes*. Ann. Inst. Pasteur, 83 : 499, 1952.
- Kaipainen, W. J.: *Does induced resistance of Bacteria to one antibiotic result in simultaneous sensitivity to other antibiotics?* Ann. med. exp. Fenn., Suppl. 1. 29. 1951.
- Klimek, J. W., Cavallito, C. J., Bailey, J. H.: *Induced resistance of Staphylococcus aureus to various antibiotics*. J. Bact. 55 : 139, 1948.
- Levaditi, C., Henry-Eveno, J.: *Recherches sur la résistance microbienne*. Rev. Immunol. 17 : 108, 1953a.
- Levaditi, C., Henry-Eveno, J.: *Antibiotiques et résistance microbienne*. Ann. Inst. Pasteur, 85 : 108, 1953b.
- Martin, R., Chabbert, Y.: *La lutte engagée entre le Staphylocoques et les antibiotiques*. Presse Méd. 61 : 673, 1953.
- Monier, J., Schoenbach, E. B.: *The resultant sensitivity of microorganisms to various antibiotics after induced resistance to each of these agents*. Antib. Chemoth., 1 : 472, 1951.
- Moustardier, G., Bentegeat, J., Lucquiaud, Ch.: *Étude de la sensibilité „in vitro“ à l'érythromycine de germes isolés chez l'enfant*. Rev. Immunol. 20 : 123, 1956.
- Nétien, G., Viallier, J., Carraz, M., Kalb, J. C.: *Action comprise de la streptomycine et de la dihydrostreptomycine sur la croissance*. Ann. Inst. Pasteur, 83 : 400, 1952.
- Pansy, F. E., Khan, P., Pagano, J. F., Donovick, R.: *The relationship between aureomycin, chloramfenicol and terramycin (18284)*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75 : 618, 1950.
- Sullivan, M., Stahly, G. L., Birkeland, J. M., Myers, W. G.: citováno podle Antibiotiki, Sborník převodných statej po proizvodstvu i eksperimentalnomu issledovaniju antibiotikov. Izdatelstvo inostrannoj literatury, Moskva 1951.
- Zzybalski, W.: *Gradient plate technique for study of bacterial resistance*. Science, 116 : 46, 1952.

К вопросу экспериментального изучения возникновения
перекрестной устойчивости у стафилококков (*Micrococcus pyogenes*)

Э. Кнедльгансова

Резюме

У 10 штаммов стафилококков наблюдалось быстрое приспособление и возникновение устойчивости к пенициллину, стрептомицину, зуреомицину, хлорамфениколу и к комбинации пенициллина и стрептомицина. От частично адаптированных штаммов происходили еще штаммы, чувствительные к антибиотикам, но от них — опять нечувствительные. Почти параллельно с устойчивостью к тому антибиотику, к которому штаммы приспособлялись, создавалось приспособление и к остальным антибиотикам исследуемого ряда. При возникновении перекрестной устойчивости дольше всего сохранялась чувствительность к зуреомицину. В процессе адаптации белый пигмент некоторых штаммов изменялся в желтый.

Experimental Contribution on the Development of Cross Resistance in *Staphylococci*
(*Micrococcus pyogenes*)

E. Knedlhansová

Summary

In ten strains of staphylococci rapid adaptation occurred and resistance developed to penicillin, streptomycin, aureomycin, chloramphenicol and a combination of penicillin and streptomycin. Partially adapted strains gave rise to sensitive strains and these in turn to non-sensitive strains. Almost in parallel with resistance to the antibiotic to which the strains were adapted, desensitization occurred to the other antibiotics of the series under investigation. During the development of cross resistance, sensitivity to aureomycin persisted the longest. In the course of adaptation, the white pigment of some strains changed to yellow.

Československá
M I K R O B I O L O G I E
ročník 2. (1957) — č. 2

Sporulace bacilů. IV.

Ovlivnění tvorby spor *Bacillus megatherium* cysteinem a cystinem

VLADIMÍR VINTER

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 22. 10. 1956

Jedním z procesů, charakteristických pro sporulaci bacilů, je převod vápníku z prostředí do buněk. V minulé práci jsme ukázali, že snížení obsahu vápníku v mediu při sporulaci mikroorganismu *Bacillus megatherium* může být příčinou labilizace proteolytických enzymů, vyloučených do prostředí během množení a vyžadujících pro svou stabilitu vápník (Vinter 1956b). Zjistili jsme také, že přidání cysteinu před sporulací do kultury *Bacillus megatherium* zabrání poklesu proteolytické aktivity media (Vinter 1956a).

Je známo, že cystein aktivuje řadu proteás. Zjistili jsme však, že v našem případě působí nikoliv na proteázy media, ale na samotný mechanismus tvorby spor, což se projevuje jednak zřetelnými změnami morfologickými, jednak biochemickými. Stejně působí i cystin. V této práci popisujeme ovlivnění morfologie tvorby spor a převodu vápníku do sporulujících buněk *Bacillus megatherium* cystinem a cysteinem.

Materiál a metody

Použili jsme kmenu *Bacillus megatherium* ze sbírek Biologického ústavu ČSAV. Způsob očkování, kultivace a stanovení procenta spor v kultuře byly tytéž jako v minulé práci (Vinter 1955), podobně i stanovení proteolytické aktivity media a stupně zřetelnosti kultury (Slavík a Smetana 1952, Vinter 1956a) a způsob barvení spor (Vinter 1956b). Teplota kultivace byla 29 °C. Tvorbu spor jsme pozorovali mikroskopem s fázovým kontrastem. Živná půda byla v pokusu, v němž jsme sledovali proteolytickou aktivitu media, obohacena přídavkem 2 mg, u ostatních pokusů 4 mg vápníku v podobě chloridu vápenatého na 1 litr půdy. Obsah vápníku v buňkách jsme stanovili spektrální analýsou plamenovým fotometrem po mineralisaci promytého sedimentu.

Roztoky cystinu a cysteinu jsme připravovali tak, že jsme rozpustili v 1 N-HCl takové množství těchto aminokyselin, abychom dosáhli koncentrace $1 \cdot 10^{-3}$ M. Roztoky jsme neutralisovali na pH 7,0 a sterilisovali buď filtrací nebo autoklávováním. Zjistili jsme, že v obou případech sterilisace vykazovaly roztoky stejný účinek na tvorbu spor. Ve všech případech jsme přidávali do kultury (k 90 ml media) 10 ml roztoku aminokyseliny, takže výsledná koncentrace cysteinu nebo cystinu v kultuře byla vždy $1 \cdot 10^{-4}$ M.

Výsledky

Morfologie tvorby spor u kultury *Bacillus megatherium* ovlivněné cysteinem nebo cystinem

Normální tvorba spor u našeho kmene *Bacillus megatherium* probíhá na půdě s kaseinovým hydrolysátem tak, že mezi 13½. až 14½. hodinou se v protoplasmě

buněk objevují na jednom konci svítivější místa velikosti spory (praespory). Při pozorování fázovým kontrastem se praespory jeví jako tmavší, nejasně ohraničená místa protoplasmu. Praespory rychle nabývají světlolomnosti a vytvářejí se mladé spory, mírně protažené, dlouhé asi jednu třetinu délky mateřské buňky, silně lámající světlo a zřetelně ohraničené vůči okolní protoplasmě buňky. Tyto mladé spory se ještě nebarví typicky při použití metod pro barvení spor, tuto vlastnost získávají teprve po dalších hodinách kultivace, počínaje asi 18. hodinou. Celý proces tvorby mladých spor trvá přibližně dvě až tři hodiny.

Přidání cysteinu nebo cystinu do živné půdy při očkování neovlivní ani délku lag-fáze, ani rychlost množení buněk. Množství buněk v kultuře po dokončení množení je přibližně stejné jako u kontrolní kultury. K tvorbě spor dochází o něco později a proces probíhá pomaleji. Část vytvořených spor je kulatější. Jestliže přidáme cystin nebo cystein v kteroukoliv hodinu kultivace až do 10. hodiny, kdy už končí růst kultury, obdržíme stejné výsledky. Po přidání těchto aminokyselin do kultury staré 11 hodin narušíme u části buněk sporulační schopnost. V kultuře se vytváří více kulatějších spor a část buněk ustrne ve svém vývoji ve stadiu praespor.

Přidání cystinu nebo cysteinu do kultury staré 12 hodin naruší proces tvorby spor prakticky u všech buněk. Kultura v této době už není schopna obnovit množení po přidání živin v počáteční koncentraci do prostředí (Vinter 1956c). Vlivem uvedených aminokyselin se opožďuje začátek tvorby spor přibližně o 2—4 hodiny. Po této době se začínají zvolna vytvářet praespory, které po dalších hodinách kultivace (počínaje asi 20. hodinou) přecházejí v útvary téměř podobné mladým sporám, lišící se však od nich nejen menší světlolomností a kulatějším tvarem, ale především neostrou ohraničeností spor vůči cytoplasmě mateřské buňky. Tyto útvary jsme pro zjednodušení dalších popisů průběhu sporulace označili jako „defektní spory“. Tyto „defektní

Tab. 1. Množství a charakteristika spor vytvořených do 24. hodiny kultivace v kultuře ovlivněné cystinem.

Stáří kultury v okamžiku přidání cystinu v hod.	Procento spor v kultuře	Charakteristika spor
9	87,9	Normální spory, často kulatější
10	85,0	Normální spory, často kulatější
11	76,6	„Defektní spory“, vzácně normální spory
12	52,5	Praespory a „defektní spory“
13	20,8	Praespory a „defektní spory“
Kontrola bez cystinu	88,1	Normální spory

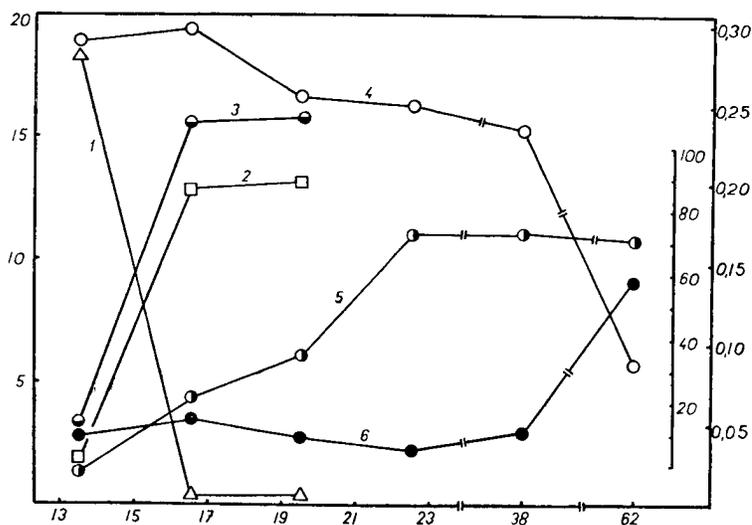
spory“ se barví stejně jako mladé spory a jsou většinou kulatější. Zatím co normální spory jsou při pozorování fázovým kontrastem světlé a mají úzký tmavý okraj, mají „defektní spory“ světlý střed zřetelně menší, tmavý okraj neostřejší a jsou menší (obr. 1—3). Jestliže přidáme cystein nebo cystin do kultury starší, dojde k silnému narušení tvorby spor, a to tak, že čím později byly uvedené aminokyseliny do kultury před sporulací přidány, tím silněji byla sporulace narušena. Přidání cystinu nebo cysteinu zastihuje buňky na různém stupni předsporulačního vývoje, proto i ovlivnění tvorby spor probíhá u buněk různě. Za několik hodin po přidání těchto aminokyselin obsahuje kultura směs buněk s praesporami, „defektními sporami“ i normálními sporami. Při zjišťování procenta těchto útvarů jsme počítali vždy jejich celkové množství.

Jako příklad uvádíme v tabulce 1 množství vytvořených spor do 24. hodiny kultivace u kultur, k nimž byl přidán cystin v různou dobu před vytvářením spor.

U normálně vysporulované kultury dochází během dalších 10—20 hodin k pozvolné autolyse buněk, které obsahují spory; dochází k uvolňování spor do prostředí. Volné spory našeho kmene *Bac. megatherium* silně lámou světlo a jsou mírně protažené (obr. 4). V kultuře ovlivněné cysteinem nebo cystinem nastává autolysa buněk, obsahujících „defektní spory“ až spory značně později. Do té doby autolysuje obvykle jen část buněk, ve kterých se spory netvořily vůbec. Spory vznikající v průběhu cystinové a cysteinové inhibice zachovávají při zrání i po uvolnění ze sporangii svůj kulatější tvar a jsou menší (obr. 5 a 6). Jsou téměř normálně světlolomné a barvi se podobně jako zralé spory.

Ovlivnění převodu vápníku do sporulujících buněk *Bacillus megatherium* cystinem a cysteinem

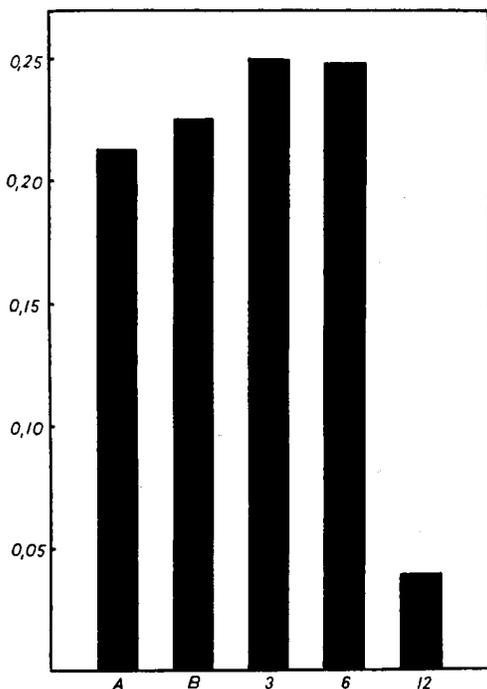
Při pokusech, v nichž jsme zjišťovali kromě procenta spor v kultuře a obsahu vápníku v buňkách též proteolytickou aktivitu media, jsme jako ovlivňující aminokyseliny použili cysteinu.



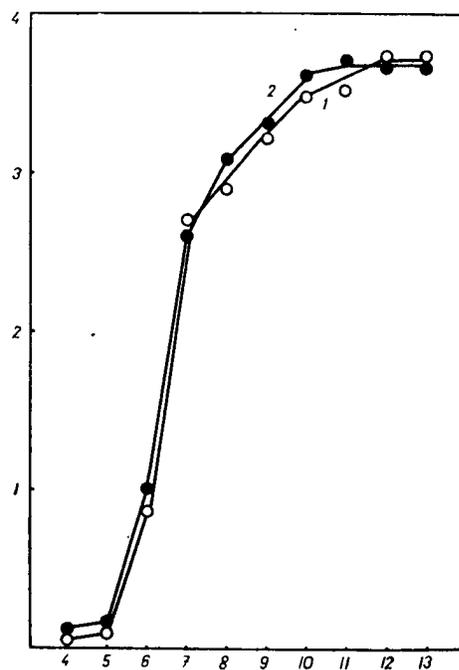
Obr. 7. Vliv cysteinu na tvorbu spor a převod vápníku do buněk přidaného do kultury *Bac. megatherium* před sporulací (v 13½. hodině kultivace.) Osa x: stáří kultury v hodinách, osa y: vlevo — počet mg kaseinu natráveného za 30 minut, vpravo — obsah vápníku v buňkách, uvnitř grafu — procento spor v kultuře. — Křivka 1 - prot. aktivita u kontrolní kultury, křivka 2 - tvorba spor u kontrolní kultury, křivka 3 - obsah Ca v buňkách v procentech váhy sušiny u kontrolní kultury, křivka 4 - prot. aktivita u kultury s cysteinem, křivka 5 - tvorba spor u kultury s cysteinem, křivka 6 - obsah Ca v buňkách u kultury s cysteinem.

Do baněk s kulturou *Bac. megatherium*, starou 13½ hodin, jsme přidali cystein do konečné koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ M. Do kontrolní kultury jsme přidali stejné množství fyziologického roztoku. Počínaje 13½. hodinou kultivace zjišťovali jsme každé tři hodiny až do 22½. hodiny procento spor v kultuře, proteolytickou aktivitu media a obsah vápníku v buňkách. Tyto analýzy jsme provedli i v 38. a 62. hodině kultivace.

U kontrolních baněk s fyziologickým roztokem došlo mezi 13½. a 16½. hodinou k normální sporulaci a k obvyklému přechodu vápníku z media do buněk, spojenému s poklesem proteolytické aktivity media. U kultury, do které jsme přidali cystein, probíhá proces tvorby spor, jak je uvedeno výše. „Defektní spory“ se objevují v kultuře teprve od 22½. hodiny a jejich množství zůstává až do 62. hodiny kultivace stejné, při čemž nepřevyšuje hodnoty kolem 70 %. Obsah vápníku v buňkách se nezvýší ani po vytvoření „defektních spor“. Teprve po delší době kultivace přechází vápník do části buněk, které jsou ve svém vývoji zřejmě nejdále.



Obr. 8. Vliv cysteinu přidaného během lag-fáze a během logaritmické fáze na tvorbu spor a převod vápníku do buněk. Osa x: stáří kultury v době přidání cysteinu, osa y: obsah vápníku v buňkách v procentech váhy sušiny, zjištěný 24. hodinu kultivace. — Kontroly: A - s fyziologickým roztokem, B - cystin přidán při očkování.



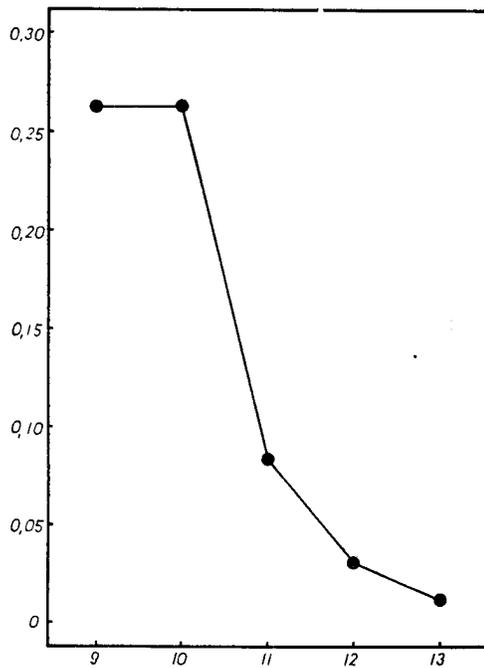
Obr. 9. Vliv cysteinu přidaného do živné půdy před očkováním (konečná koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ M) na růst kultury *Bac. megatherium*. Osa x: stáří kultury v hodinách, osa y: stupeň zákalu kultury, vyjádřený v hodnotách optické density $\times 10$. Křivka 1 - kultura s cystinem, 2 - kontrola s fyziologickým roztokem.

Proteolytická aktivita media se v prvních hodinách po přidání cysteinu poněkud sníží, později zůstává prakticky nezměněna. Po několika desítkách hodin další kultivace, kdy část vápníku přechází z media do buněk s „defektními spory“, dochází též k denaturaci části proteás a proteolytická aktivita media se poněkud sníží. Výsledky jednoho z těchto pokusů jsou vyjádřeny na obr. 7.

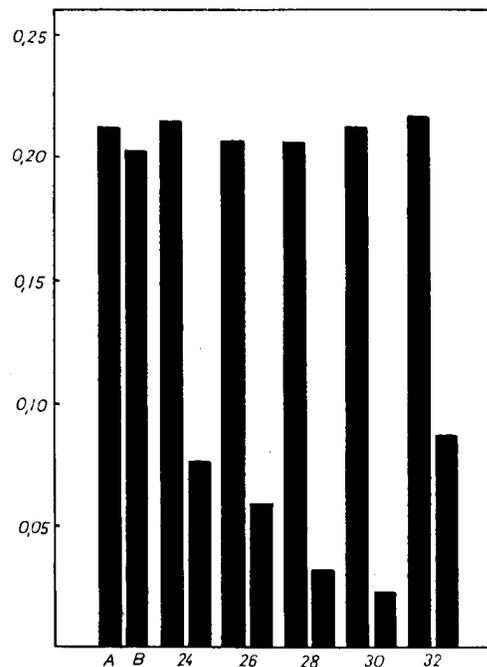
Zjistili jsme, že stejný účinek na tvorbu spor a zapojování vápníku do buněk jako cystein má i cystin (Vinter 1956c). Obě aminokyseliny ovlivňují tvorbu spor a převod vápníku do media i v prostředí s nadbytkem vápníku (tab. 2). V dalších pokusech jsme použili jako ovlivňujícího činitele cystinu.

Sledovali jsme především, jak přidání cysteinu do různě staré kultury ovlivní zapojování vápníku do sporulujících buněk *Bac. megatherium*. Cystin jsme přidávali

do kultury v koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M při očkování, v lag-fázi a v logaritmické fázi. Po 24. hodině jsme stanovili obsah vápníku v buňkách a procento spor v kultuře. Ve všech uvedených případech došlo k normální tvorbě spor a k převodu vápníku z media do sporulujících buněk. Poněkud více vápníku obsahoval sediment buněk z kultury, do které jsme přidali cystin v 3. a 6. hodině kultivace. Také procento spor bylo v těchto kulturách o něco vyšší. V kontrolní kultuře, do které jsme přidali cystin až před sporulací (12. hodinu kultivace), došlo k obvyklému narušení tvorby spor (vytvořilo se pouze kolem 40 % praespor až „defektních spor“), spojenému



Obr. 10. Zapojování vápníku do buněk při sporulaci *Bac. megatherium* po přidání cystinu do různé staré kultury. Obsah vápníku jsme zjistili 24. hodinu kultivace. Osa *x*: stáří kultury v době, kdy byl přidán cystin, osa *y*: obsah vápníku v buňkách v procentech váhy sušiny.



Obr. 11. Odolnost buněk vůči inhibici tvorby spor cystinem u kultury vyrostlé na půdě s cystinem. Osa *x*: stáří kultury v okamžiku, kdy byl stanoven obsah vápníku. V prvním sloupci je vždy hodnota přizpůsobené kultury, ve druhém kultury nepřizpůsobené. Osa *y*: obsah vápníku v buňkách v procentech váhy sušiny. Kontroly s fyziologickým roztokem: A - přizpůsobená kultura, B - nepřizpůsobená kultura.

s omezením vstupu vápníku do buněk (obr. 8). Přidání cystinu do media při očkování nemělo vliv ani na rychlost množení, ani na hodnoty nárůstu kultury (obr. 9).

V dalších pokusech jsme přidávali cystin do kultury později, počínaje obdobím ukončení vegetativního množení. Když jsme cystin přidali po ukončení růstu kultury (v 9. a 10. hodině kultivace), vytvořily se do 24. hodiny normální spory a vápník přešel do buněk. Ke zlomu v citlivosti kultury vůči cystinu došlo před 11. hodinou kultivace. Od tohoto období narušilo přidání cystinu do kultury silně mechanismus tvorby spor i převod vápníku do sporulujících buněk. Hodnoty obsahu vápníku v buňkách, zjištěné ve 24. hodině kultivace, jsou uvedeny na obrázku 10.

Při další práci jsme zjistili, že přizpůsobení kultury vůči cystinu zvyšuje odolnost kultury vůči této aminokyselině, přidané znovu před sporulací. Kultivovali jsme *Bac. megatherium* jednak v přítomnosti cystinu (koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ M), jednak bez něho. Ve 12. hodinu kultivace jsme do obou serií baněk přidali cystin ve stejné koncentraci, do kontrolních baněk fyziologický roztok. Obsah vápníku v buňkách a procento spor v kultuře jsme stanovili počínaje 24. hodinou kultivace každé dvě hodiny až do 32. hodiny.

Tab. 2. Vliv cysteinu a cystinu na zapojování vápníku do buněk *Bacillus megatherium* při sporulaci v prostředí s nadbytkem vápníku. Obsah vápníku v buňkách byl stanoven ve 24. hodině kultivace. Pro usnadnění popisu stavu kultury jsme v tabulce označili preasporu písmenem P, „defektní spory“ DS a normální spory S.

Ve 12. hodině přidáno do kultury	Obsah vápníku v buňkách	Procento spor v kultuře
Fyziologický roztok (kontrola)	0,263	84,5 S
Vápník ($6 \cdot 10^{-4}$ M, kontrola)	0,271	87,3 S
Cystein ($1 \cdot 10^{-4}$ M)	0,035	56,2 P-DS
Cystein ($1 \cdot 10^{-4}$ M) a vápník ($6 \cdot 10^{-4}$ M)	0,041	43,6 P-DS
Cystin ($1 \cdot 10^{-4}$ M)	0,062	38,5 P-DS
Cystin ($1 \cdot 10^{-4}$ M) a vápník ($6 \cdot 10^{-4}$ M)	0,064	59,6 P-DS

Tab. 3. Zvrat cystinové inhibice tvorby spor *Bacillus megatherium* nadbytkem glukosy. Pro popis stavu kultury jsme použili stejného označení jako v tabulce 2.

Ve 12. hodině přidáno do kultury	Obsah vápníku v buňkách	Procento spor v kultuře
Fyziologický roztok (kontrola)	0,243	88,4 S
Glukosa (kontrola) $5 \cdot 10^{-4}$ M	0,236	84,9 S
Glukosa (kontrola) $5 \cdot 10^{-3}$ M	0,248	87,6 S
Cystin ($1 \cdot 10^{-4}$ M)	0,029	41,3 P-DS
Cystin a glukosa ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	0,031	49,7 P-DS
Cystin a glukosa ($5 \cdot 10^{-3}$ M)	0,173	83,9 DS-S

Tab. 4. Vliv přidání siričku sodného (konečná koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ M) do různě staré kultury na zapojování vápníku do sporulujících buněk *Bacillus megatherium*. Popis stavu kultury je stejný jako v tab. 2. Obsah vápníku v buňkách byl stanoven 24. hodinu kultivace.

Stáří kultury v okamžiku přidání siričku v hod.	Obsah vápníku v buňkách 24. hodinu kultivace	Procento spor v kultuře 24. hodinu kultivace
10	0,232	69,4 kulatějších S
11	0,241	72,1 kulatějších S
12	0,176	66,2 DS-S
13	0,085	63,7 P-DS
Fyziologický roztok (kontrola)	0,237	86,9 S

U kontrol došlo k normální sporulaci a k převodu vápníku do buněk. U kultury vyrostlé za přítomnosti cystinu proběhla i po opětovném přidání cystinu sporulace normálně a buňky zapojily do své struktury obvyklé množství vápníku. U kultury

vyrostlé v mediu bez cystinu došlo po přidání této látky před sporulací k obvyklému narušení tvorby spor (v kultuře se nevytvořilo více než 50 % praespor až „defektních spor“) a množství vápníku v buňkách zůstalo nízké. Výsledky pokusů jsou uvedeny na obrázku 11.

Silný nadbytek glukosy, přidáný současně s cystinem, snižuje inhibiční účinek této aminokyseliny na tvorbu spor. Do kultury *Bac. megatherium* jsme před sporulací (12. hodinu kultivace) přidali jednak samotný cystin ($1 \cdot 10^{-4}$ M), jednak cystin s nadbytkem glukosy ($50 \cdot 10^{-4}$ M a $5 \cdot 10^{-4}$ M). Do kontrolních baněk jsme přidali glukosu a fyziologický roztok. Ve 24. hodině kultivace jsme mikroskopicky zjistili stav kultury a v buňkách stanovili obsah vápníku.

V kontrolních baňkách došlo jak po přidání glukosy, tak fyziologického roztoku k normální sporulaci a k zapojení vápníku do buněk. V kultuře, kam jsme přidali cystin samotný nebo s malým nadbytkem glukosy ($5 \cdot 10^{-4}$ M), došlo k shodnému narušení tvorby spor a obsah vápníku v buňkách zůstal nízký. V kultuře, kam byla současně s cystinem přidána glukosa ve značném nadbytku ($50 \cdot 10^{-4}$ M), se vytvořila směs spor a „defektních spor“, při čemž spor bylo asi dvě třetiny z celkového počtu. Také obsah vápníku v buňkách byl podstatně vyšší. Silný nadbytek glukosy přidané spolu s cystinem tedy značně omezil inhibici tvorby spor touto aminokyselinou. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Při sledování otázky specifity účinku cysteinu a cystinu na tvorbu spor jsme zjišťovali též vliv mnoha jiných látek. Vyzkoušeli jsme některé aminokyseliny (alanin, methionin, glutamovou kyselinu), glutathion a thioglykolát. Žádná z těchto látek, přidávaných před sporulací do kultury, neovlivní tento proces. Sporulaci neovlivnily ani anorganické sloučeniny síry jako síran sodný, sirnatan sodný a siřičitan sodný. Pouze po přidání siřičitanu sodného v koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M do kultury před sporulací dochází k podobnému narušení tvorby spor jako při použití cystinu. V tabulce 4 jsou uvedeny hodnoty vápníku a procenta spor ve 24. hodině kultivace u kultury, do které byl přidán siřičitan sodný v různou dobu před sporulací. Nejvíce je ovlivněna kultura, do níž byl přidán siřičitan sodný před samotnou tvorbou spor (13. hodinu kultivace). U kultur, k nimž byl přidán siřičitan v 10., 11. nebo 12. hodině, vytvořilo pouze asi 70 % buněk spory nebo „defektní spory“. Ionty CN^- přidávané v koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M před sporulací, nemají na tento proces téměř vliv (Vinter 1956c).

Diskuse

Při sledování účinku cysteinu a cystinu na sporulační mechanismus jsme zjistili, že tyto aminokyseliny působí nejsilněji, jsou-li přidány před samotnou tvorbou spor, tedy v době, kdy už je zřejmě buňky nemohou rychle metabolizovat.

Nejběžnější cestou rozkladu cystinu u mikroorganismů je pravděpodobně redukce na cystein (Kallio a Porter 1950, Romano a Nickerson 1954) a dále deaminace a desulfhydrace této aminokyseliny. Z literatury je známo, že první fáze rozkladu cysteinu je urychlována přidávkem glukosy (Tamiya 1951, 1954). Během našeho studia vlivu cysteinu a cystinu na tvorbu spor *Bacillus megatherium* uveřejnili Benigno, Visentini a Franceschini (1955) práci, ve které popisují bakteriostatický účinek cysteinu vůči *E. coli*. Tito autoři uvádějí, že účinným je možno zvrátit velkým nadbytkem pyrohroznové kyseliny.

Zásahy, o kterých se domníváme, že vedou k rychlejšímu rozkladu cystinu, na příklad přizpůsobení kultury této aminokyselině, nebo možné zvýšení respirace vlivem nadbytku glukosy, zvyšují odolnost kultury vůči cystinové inhibici tvorby spor.

Výsledky pokusů s oběma aminokyselinami a siřičikem ukázaly, že v účinku těchto látek je jistá podobnost. Tato skutečnost by mohla nasvědčovat tomu, že účinným

činitelem při inhibici tvorby spor jsou skupiny SH, ať v podobě cysteinu nebo siro-
vodíku.

Spory bacilů obsahují mnohem méně SH-skupin než vegetativní buňky (Mortenson a Beinert 1953). Cytochemickou metodou zjistil Widra (1956), že praespory *Bacillus megatherium* a *Bacillus mycoides* obsahují zvýšené množství SH-skupin, vázaných v proteinech, a že při přechodu praespory ve sporu dochází zřejmě k snížení jejich množství. Je možné, že snížení obsahu SH-skupin v buňkách během sporulačního procesu je jedním z mechanismů, které zajišťují sporám vysokou odolnost vůči řadě škodlivých činitelů.

Domníváme se, že přidání sloučenin, které mohou zvýšit obsah SH-skupin v buňce ať přímo, nebo po rozkladu, může v tomto období značných změn v obsahu SH-skupin narušit normální sled biochemických reakcí vedoucích k vytváření spor.

Dalším mechanismem, který vede k zvyšování odolnosti spor, je přechod vápníku do sporulujících buněk (Curran, Brunstetter a Myers 1943, Powell 1953, Powell a Strange 1956, Sugiyama 1951, Tinelli 1955a, b, Vinter 1956b, c). Při studiu tvorby spor *Bacillus megatherium* narušené cysteinem nebo cystinem jsme zjistili, že přechod vápníku z media do buněk je narušen. Vápník je ve sporách vázán na kyselinu 2,6-dipikolinovou (Perry a Foster 1955, Powell 1953, Powell a Strange 1956, Tinelli 1955a, b). Je možné, že při porušení sledu praesporulačních mechanismů výše uvedenými látkami je narušena též syntéza dipikolinové kyseliny a nedojde tedy k převodu vápníku do buněk. Ve studiu inhibice tvorby spor *Bacillus megatherium* cysteinem a cystinem budeme dále pokračovat.

Souhrn

1. Přidání aminokyselin cystinu nebo cysteinu (konečná koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ M) před tvorbou spor do kultury *Bacillus megatherium* silně naruší tento proces. Začátek sporulace se opozdí a proces ustrne na delší dobu ve stadiu praespor a útvarů, které jsme označili jako „defektní spory“. Inhibice tvorby spor je provázána omezením vstupu vápníku do sporulujících buněk. „Defektní spory“ neobsahují více vápníku než vegetativní buňky.

2. Účinek cystinu na tvorbu spor *Bacillus megatherium* závisí na tom, v které době kultivace byl přidán do kultury. Narušení tvorby spor se projevuje teprve po přidání cystinu do kultury nacházející se v předsporulačním stadiu, a to tak, že čím starší je kultura v okamžiku přidání, tím silnější je účinek.

3. Kultivace *Bacillus megatherium* za přítomnosti cystinu zvyšuje odolnost kultury vůči účinku této aminokyseliny, znovu přidané před sporulací.

4. Inhibici tvorby spor cystinem můžeme částečně zvrátit přidáním značného nadbytku glukosy spolu s touto aminokyselinou.

5. Podobný inhibiční účinek na tvorbu spor *Bacillus megatherium* jako cystein a cystin vykazuje i siričnan sodný.

Autor děkuje Marii Součkové za technickou spolupráci.

Literatura

- Benigno, P., Visentini, P., Franceschini, V.: *Ricerche sul meccanismo della batteriostasi. Modificazioni nel metabolismo dell' E. coli per azione della cisteina*. Ricerca Sci. 25 : 828, 1955.
- Curran, H. R., Brunstetter, B. C., Myers, A. T.: *Spectrochemical analysis of vegetative cells and spores of bacteria*. J. Bact. 45 : 485, 1943.
- Kalio, R. E., Porter, J. R.: *The metabolism of cystine and cysteine by Proteus vulgaris and Proteus morganii*. J. Bact. 60 : 607, 1950.
- Mortenson, L. E., Beinert, H.: *Appearance of sulphydryl groups during growth of Bac. globigii*. J. Bact. 66 : 101, 1953.

- Perry, J. J., Foster, J. W.: *Studies on the biosynthesis of dipicolinic acid in spores of Bacillus cereus var. mycooides*. J. Bact. 69 : 337, 1955.
- Powell, J. F.: *Isolation of dipicolinic acid (pyridine 2,6-dicarboxylic acid) from spores of Bacillus megatherium*. Biochem. J. 54 : 210, 1953.
- Powell, J. F., Strange, R. E.: *Biochemical changes occurring during sporulation in Bacillus species*. Biochem. J. 63 : 661, 1956.
- Romano, A. H., Nickerson, W. J.: *Cystine reductase of pea seeds and yeasts*. J. Biol. Chem. 208 : 409, 1954.
- Slavík, K., Smetana, R.: *Stanovení aktivity proteolytických enzymů biuretovou reakcí*. Chem. listy 46 : 649, 1952.
- Sugiyama, H.: *Studies on factors affecting the heat resistance of spores of Clostridium botulinum*. J. Bact. 62 : 81, 1951.
- Tamiya, N.: *Aerobic decomposition of cysteine by Escherichia coli*. J. Chem. Soc. Japan., Pure Chem. Sect. 72 : 118, 1951.
- Tamiya, N.: *Aerobic decomposition of cysteine by Escherichia coli*. I., J. Biochem. (Tokyo) 41 : 199, 1954.
- Tinelli, R.: *Étude de la biochimie de la sporulation chez Bacillus megatherium*. I. *Composition des spores obtenues par carence des différents substrats carbonés*. Ann. Inst. Pasteur 88 : 212, 1955a. — II. *Modifications biochimiques et échanges gazeux accompagnant la sporulation provoquée par carence de glucose*. Ann. Inst. Pasteur 88 : 364, 1955b.
- Vinter, V.: *Nerovnocennost buněk Bacillus megatherium v průběhu sporulace*. Čs. biologie 4 : 294, 1955.
- Vinter, V.: *Sporulace bacilů*. II. *Proteolytické enzymy v procesu sporulace u Bacillus megatherium*. Čs. mikrobiol. 1 : 63, 1956a. III. *Přechod vápníku do buněk a pokles proteolytické aktivity prostředí při sporulaci Bacillus megatherium*. Čs. mikrobiol. 1 : 145, 1956b.
- Vinter, V.: *Základní biologické a biochemické projevy při sporulaci*. Kandidátská disertační práce. Praha 1956c.
- Widra, A.: *Studies on the cytochemistry of bacteria*. J. Bact. 71 : 689, 1956.

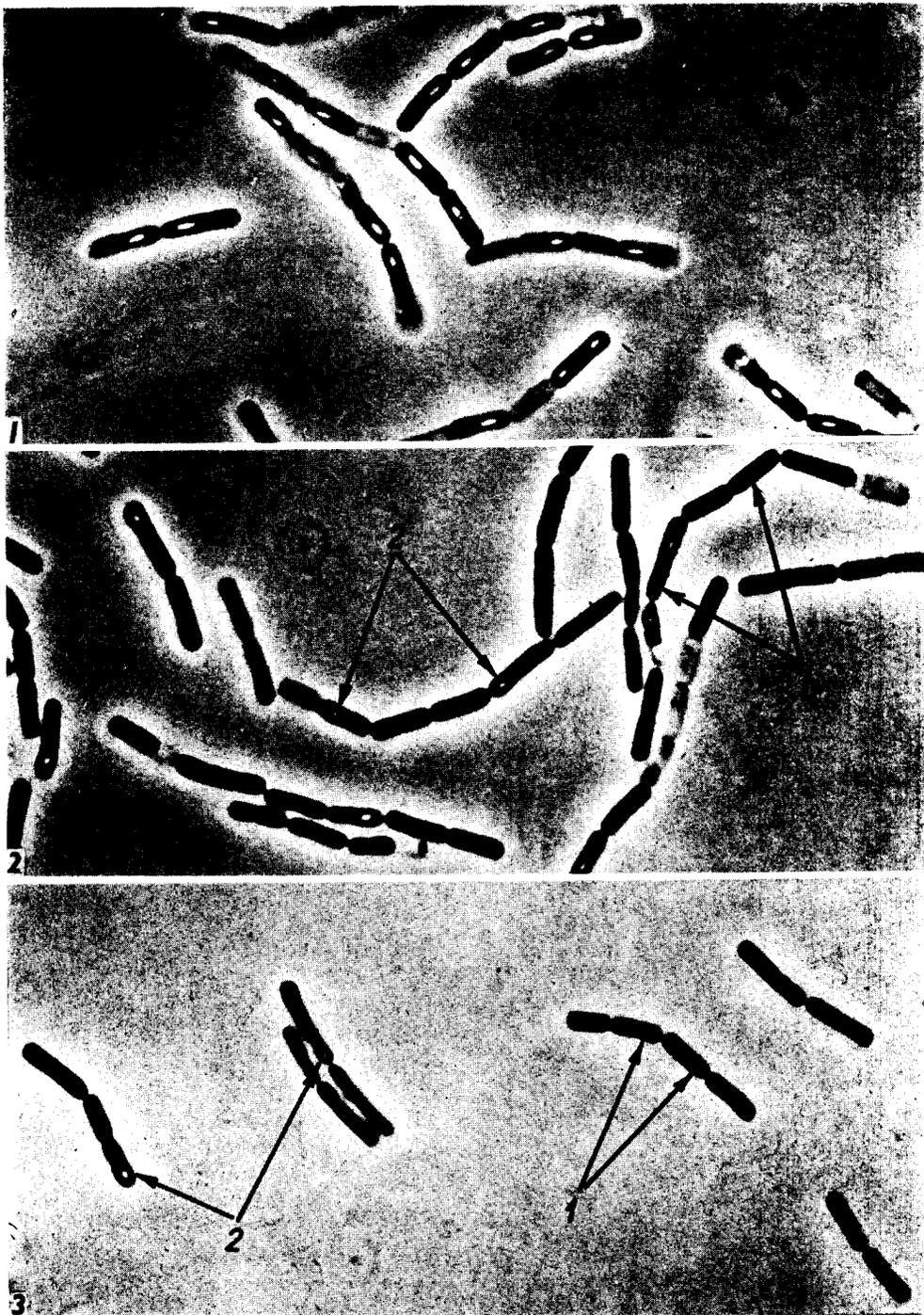
Спорообразование бацилл. IV.

Воздействие цистеином и цистином на образование спор у *Bacillus megatherium*

В. Винтер

Р е з ю м е

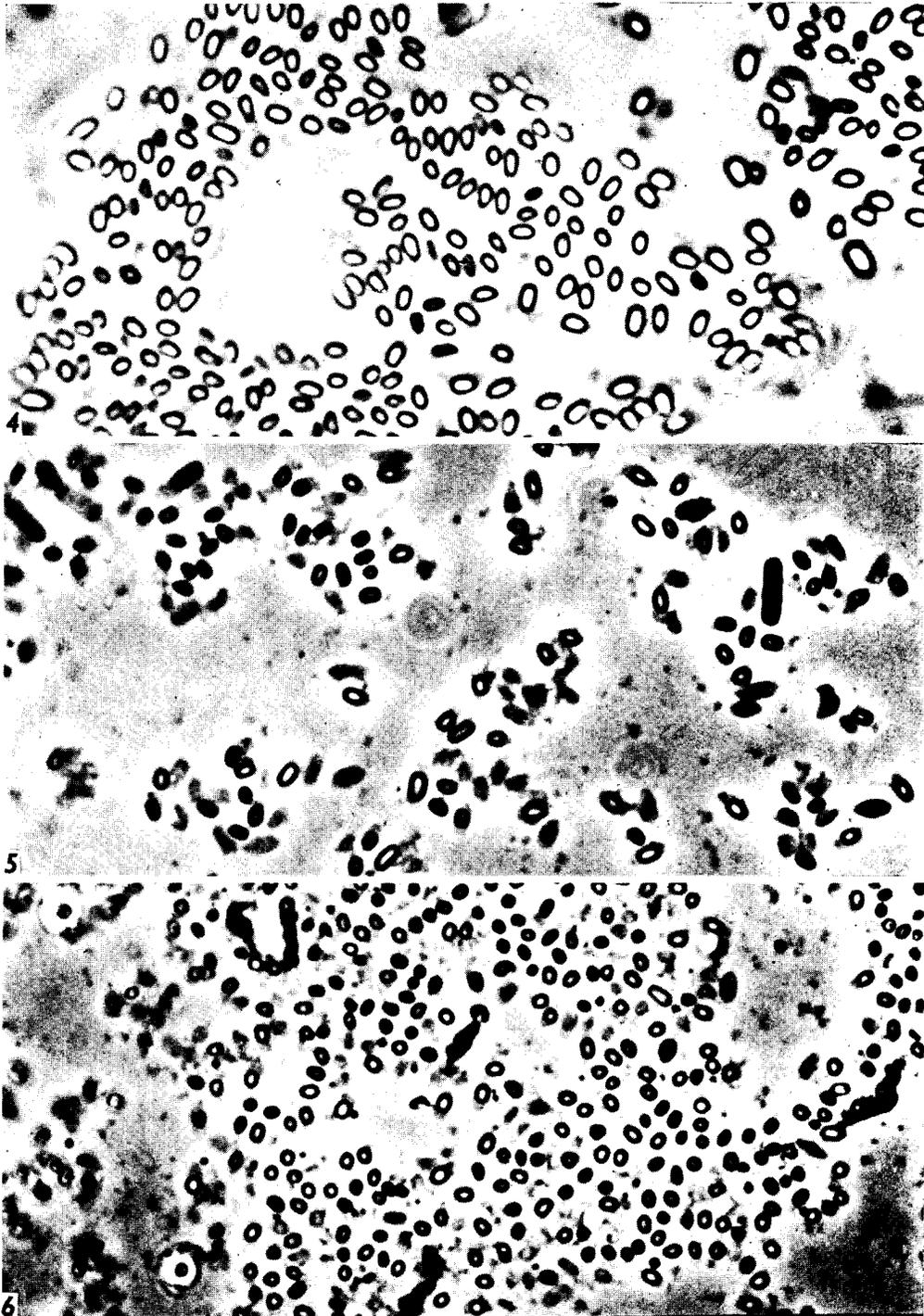
Прибавление к культуре *Bacillus megatherium* аминокислот цистина или цистеина (в окончательной концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М) перед образованием спор сильно нарушает этот процесс: начало спорообразования запаздывает, и процесс на долгое время приостанавливается в стадии «преспор» и образований, которые мы назвали «дефектными спорами». Подавление образования спор сопровождается ограничением проникновения кальция в образующие споры клетки. «Дефектные споры» содержат кальция не больше, чем вегетативные клетки. Действие цистина на спорообразование у *B. megatherium* зависит от того, в какой период культивации он был прибавлен к культуре: нарушение образования спор проявляется только после прибавления цистина к культуре в предспорообразовательной стадии. И чем старше культура в момент его прибавления, тем сильнее действие. Культивация *B. megatherium* в присутствии цистина повышает устойчивость культуры по отношению к новому прибавлению этой аминокислоты перед спорообразованием. Подавление спорообразования цистином можно умерить путем одновременного прибавления значительного избытка глюкозы. Подобное подавляющее действие, как цистин и цистеин, оказывает на спорообразование *B. megatherium* и сернистый натрий.



Obr. 1. Preparát z neovlivněné vysporulované kultury, staré 22 hodin.

Obr. 2. Preparát z kultury, staré 22 hodin, do které byl 12. hodinu kultivace přidán cystein.

Obr. 3. Preparát z kultury staré 22 hodin, do které byl 12. hodinu kultivace přidán cystin. Na snímcích jsou vyznačeny příklady praespor (1) a „defektních spor“ (2). Zvětšeno 2000krát.



Obr. 4. Normální volné spory v kultuře staré 82 hodin.

Obr. 5. Směs normálních a kulatějších spor z kultury, staré 82 hodin, k níž byl přidán cystin 10. hodinu kultivace.

Obr. 6. Volné spory z kultury, staré 82 hodin, k níž byl přidán cystin 11. hodinu kultivace.
Snímky pořídil za použití fázového kontrastu J. Fiala. Zvětšeno 2000krát.

Sporulation of Bacilli. IV.

The Effect of Cystine and Cysteine on Spore Formation in *Bacillus megatherium*

V. Vinter

S u m m a r y

The addition of the amino acids cystine or cysteine (final concentration 1×10^{-4} M) to a culture of *Bacillus megatherium* prior to the formation of the spores markedly disorganises this process. The commencement of sporulation is delayed and the process is halted for a considerable time at the pre-spore stage and that of formations which we have termed „defective spores“. Inhibition of spore formation is accompanied by a reduction in the uptake of calcium into the sporulating cells. The cells with „defective spores“ do not contain more calcium than vegetative cells. The effect of cystine on the formation of spores of *Bacillus megatherium* depends on the point at which it is added to the culture. Inhibition of spore formation is manifested only when cystine is added to the culture in the presporulation period, the degree of inhibition being in direct proportion to the age of the culture at the moment when the cystine is added. The cultivation of *Bacillus megatherium* in the presence of cystine increases resistance of the culture to the action of this amino acid when added again prior to sporulation. Inhibition of spore formation by cystine can be partially reversed by adding a considerable excess of glucose together with the amino acid. Sodium sulphide has a similar inhibitory effect on the formation of spores of *Bacillus megatherium* to that of cysteine and cystine.

Československá
M I K R O B I O L O G I E

ročník 2. (1957) — č. 2

Význam shlukovacího faktoru pro choroboplodnost stafylokoků

JIŘÍ JOHANOVSKÝ

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 13. 10. 1956

Tvorba koagulázy je pokládána všeobecně za nejspolehlivější průkaz choroboplodnosti stafylokoků a její určení je nezbytnou a osvědčenou metodou diagnostickou. Přisuzuje se jí též značná role při vzniku stafylokokové infekce (Smith a sp. 1947, Boake 1956). Vedle vlastního průkazu koagulázy je často prováděn i jiný test, aglutinace plasmatu na sklíčku, s téměř úplnou korelací (Cadness-Graves a sp. 1943, Lukeš a Wagner 1954). Teprve nedávno bylo prokázáno, že za tuto reakci odpovídá nikoliv koagulasa, nýbrž jiná látka, účinkující odchylným mechanismem a s jinými antigenními vlastnostmi, t. zv. shlukovací faktor (clumping factor — Duthie 1954).

Pokusili jsme se o objasnění významu shlukovacího faktoru pro vznik a průběh experimentální stafylokokové infekce, a to podle odchylného průběhu infekce na různých pokusných modelech při použití stafylokokových kmenů se shlukovacím faktorem a kmenů, jímž tato látka chybí.

Materiál a metody

U použitých kmenů jsme zjišťovali kvalitativně a většinou i kvantitativně tvorbu α toxinu, δ lysinu, specifického leukocidinu (Johanovský 1957), hyaluronidázy (MCP testem), fibrinolysinu (Lack a Wailing 1954) a lecithinázy (Gillespie a Adler 1952). Shlukovací faktor jsme zjišťovali orientačně aglutinací v králíčí plasmě na sklíčku s kontrolami na autoaglutinaci a kvantitativně ve zkumavkách na třepačce (Duthie 1954). Tvorbu koagulázy jsme zjišťovali běžným způsobem v plasmě králíčí a lidské, ředěné 1 : 5. V pokusech bylo užito celkem 15 kmenů tvořících shlukovací faktor a 8 kmenů bez shlukovacího faktoru. Ostatní vlastnosti byly u použitých kmenů vyjádřeny různě intenzivně, bez závažných rozdílů mezi oběma skupinami.

K infekci jsme použili daných kmenů vždy v kultuře staré 4 hod., smyté s krevního agarů a standardované fotometricky. Bílé myšky jsme infikovali intraperitoneálně a králíky (čičily) intradermálně. Letalitu pro myšky jsme určili v opakovaných pokusech jako dávku s 50 % úmrtností, nebo z rozmezí dávek smrtelných ve 100 % a nesmrtelných. K tomuto druhému výsledku docházelo často i při rozdílu velikosti dávek pouze o 50 % (na př. 100 a 150 milionů mikrobů). Hodnocení zánětlivých reakcí viz Johanovský (1956a); údaje o plošné velikosti byly zjištěny výpočtem z velikostí dvou na sebe kolmých průměrů. Materiál ze středu kožní leze jsme odbírali po nařiznutí kůže bakteriologickou klíčkou, vždy třikrát, a kultivovali na krevním agaru. Jestliže se počet vyrostlých kolonií v některé z těchto tří kultivací lišil o více než 100 % od jejich průměru, byl celý výsledek jako metodicky nespolehlivý vyrazen z hodnocení (asi 15 % případů). Produkce toxinu z izolovaných kmenů byla zjišťována pomocí kultivace na celofánu.

Výsledky

V prvních pokusech jsme zjišťovali, jak se liší u myšek choroboplodnost kmenů normálních a kmenů netvořících shlukovací faktor (tab. 1). Ukázalo se, že vyšší

choroboplodnost závisí jednak na intenzitě tvorby α toxinu, jednak na přítomnosti shlukovacího faktoru. Kmeny bez shlukovacího faktoru jsou přes pozitivní tvorbu ostatních toxinů a enzymů o něco méně patogenní.

Tab. 1. Vliv tvorby α toxinu a shlukovacího faktoru na velikost smrtelné dávky stafylokoků pro myšky. V tabulce uvedena velikost smrtelné dávky jednotlivých stafylokokových kmenů v milionech mikrobů.

Shlukovací faktor	Tvorba α toxinu								
	1 : 80 — 1 : 640				1 : 2560 — 1 : 10240				
+	120	160	200		40	80	100	120	120
	200	400	500		120	160	160	160	
-	160	500	800	1000	120	160	160	300	

Tab. 2. Průměrné trvání a rozsah zánětlivých reakcí po intradermální infekci králíků stafylokokovými kmeny s různou tvorbou shlukovacího faktoru. V pokuse 8 kmenů pozitivních, 4 negativní, celkem 316 kožních testů.

Shlukovací faktor	Relativní změny velikosti zánětlivé reakce mezi jednotlivými dny			
	1.—2. den	1.—3. den	2.—4. den	4.—7. den
+	173 ± 48 %	254 ± 96 %	101 ± 27 %	46 ± 16 %
-	83 ± 31 %	55 ± 13 %	31 ± 16 %	nelze hodnotit

Tab. 3. Počet mikrobů získaných v jednom z pokusů při kultivacích z kůže králíků infikovaných kmeny tvořícími a netvořícími shlukovací faktor. Dávka 40 milionů mikrobů intradermálně, čísla od 50 zaokrouhlena.

Doba kultivace po vstříknutí infekce	Shlukovací faktor															
	přítomen								nepřítomen							
48 hod.	0	0							0	0	0	0	0	0	0	0
	3	3							1	2	2	3	3	4	8	
	22	25	50	90	90				21	30	40	42	50	60	85	90
	120	120	130	130	150	170	170		120	150						
	180	190	190	210	240	370	420									
96 hod.	0	0	0						0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	3	3	5	6	6	8	10	1	1	1	1	2	2	8
	12	15	15	15	15	20	20			17	25	30	50	60		
	32	50	60	60	80	80			110							
	110	120	200													

Opakovali jsme též pokusy (Smith, Hale a Smith 1947) o vlivu vstříknutí koagulovatelného plasmatu na infekčnost stafylokoků u myšek. Obdrželi jsme negativní výsledky. Z celkem 148 myšek naočkovaných stafylokoky spolu s králičí plasmou uhynulo 128, přežilo 20 a v kontrolní skupině, které bylo vstříknuto místo plasmu králičího serum, uhynulo 122 a přežilo 26 myšek.

Další pokusy jsme konali na králících na modelu intradermální infekce. Zjistili jsme, že při prosté infekci a sledování vzniku nekrosy není za 24 a 48 hodin podstat-

ného rozdílu mezi našimi skupinami kmenů; vznik nekrosy je závislý především na tvorbě α toxinu. Proto jsme zvolili jiný postup, a to intradermální infekci dávkou, vedoucí pouze ke vzniku reakce zánětlivé a jen ojediněle též k nevelkým nekrosám. Změny zánětlivé reakce jsme sledovali makroskopicky denně po dobu jednoho týdne a vyjádřili relativně v procentech jako zvětšení nebo zmenšení reakce vzhledem k předchozímu odčítání (tab. 2).

Tab. 4. Vliv tvorby shlukovacího faktoru na schopnost stafylokoků udržovat se po intradermální infekci v kůži králíka. Souhrn všech pokusů, v tabulce uveden počet případů s daným výsledkem.

Shlukovací faktor	Počet kultivovaných mikrobu			
	0	1–10	11–100	101–1000
+	10	15	57	88
–	27	35	39	25

Tab. 5. Změny intenzivnosti hemolysy v průběhu infekce u kmenů s různou tvorbou shlukovacího faktoru. V tabulce počet případů s daným výsledkem. Výklad značek: ++ zona hemolysy 2–3 mm, + zona 0,5–1 mm, ± hemolysa pouze pod kolonií.

Shlukovací faktor	Intenzita hemolysy před infekcí			Celkem testů	Intenzita hemolysy v primokultuře z infikovaného organismu				Celkem testů
	++	+	–		++	+	±	–	
	+	17	6		1	24	27	17	
–	14	6	0	20	6	4	10	13	33

Tab. 6. Změny titru δ lysinu v průběhu infekce u kmenů s různou tvorbou shlukovacího faktoru. V tabulce počet případů s daným výsledkem.

Shlukovací faktor	Titř δ lysinu před infekcí			Celkem pokusů	Titř δ lysinu u kmenů izolovaných z infikovaného organismu			Celkem pokusů
	0–1 : 20	1 : 40– –1 : 80	1 : 160– –1 : 320		0–1 : 20	1 : 40– –1 : 80	1 : 160– –1 : 320	
	+	4	10		2	16	4	
–	2	5	1	8	6	7	1	14

Infekce kmeny, netvořícími shlukovací faktor, se liší od průběhu infekce kmeny s touto látkou. Největší reakce jsou v prvním případě za 24 hodin, pak se jejich rozsah rychle zmenšuje. Naopak kmeny, tvořící shlukovací faktor, vyvolávají nejsilnější zánětlivou reakci druhý a třetí den infekce a její zanikání je zpomaleno. Podobný výsledek jsme obdrželi i v těch několika málo případech, kdy došlo ke vzniku nekrosy.

V pěti pokusech, celkem na 18 králících, jsme provedli za 2–4 dny po infekci současně u obou skupin kmenů kultivaci z kožních lesí se stanovením počtu vyrostlých

kolonií. Výsledek ukazuje, že delšímu trvání a intenzitě zánětlivých reakcí u kmenů se shlukovacím faktorem odpovídá i větší počet kultivovaných mikrobů. V zánětlivých lesích, vyvolaných kmeny bez shlukovacího faktoru, nacházíme podstatně častěji jen ojedinelé mikroby nebo kultivaci zcela negativní (tab. 3 a 4).

Kultivované mikroby se liší nejen počtem, ale i kvalitativními vlastnostmi. U skupiny kmenů bez shlukovacího faktoru je v primokultuře z infikovaného organismu snížena oproti původnímu stavu tvorba α toxinu, určená podle zony hemolysy na agaru s králíčí krví (tab. 5). Při produkci toxinu z izolovaných kmenů nacházíme nejvýraznější změny v titru δ lysinu, a to opět snížení u kmenů bez shlukovacího faktoru (tab. 6). Je třeba zdůraznit, že zde jde nikoliv o primárně rozličnou tvorbu těchto látek, nýbrž o změny, k nimž dochází v průběhu infekčního procesu.

Diskuse

V této práci jsme si kladli otázku, jakou účast má shlukovací faktor na průběhu stafylokokové infekce u pokusných zvířat. Pracovali jsme se dvěma skupinami kmenů s plným toxickým a enzymatickým vybavením, avšak lišících se v tvorbě shlukovacího faktoru. Zjistili jsme, že kmeny bez shlukovacího faktoru se liší ve své choroboplodnosti od kmenů tvořících tuto látku. Částečně snížená patogenost se ukázala při letální infekci myšek a jasné rozdíly při místní infekci u králíků. Na tomto modelu jsme zjistili u kompletních kmenů oproti kmenům bez shlukovacího faktoru delší trvání zánětlivých reakcí. V souhlasu s tím nalézáme v nich větší množství přežívajících mikrobů a tyto mikroby si uchovávají plnou toxigenost; kmeny bez shlukovacího faktoru rychle mizí ze zánětlivých lesí a kultivujeme je v oslabeném stavu, se sníženou nebo vymizelou tvorbou toxických látek (viz i Johanovský 1956b). Z výsledků vyplývá, že shlukovací faktor má reálný význam pro choroboplodnost stafylokoků. Podobně zjistili Selbie a Simon (1952) při intramuskulární infekci myšek, že kmeny se silnou tvorbou shlukovacího faktoru vytvářejí o něco větší otok než kmeny se slabou tvorbou této látky. Jako u mnoha jiných autorů, ukazují současně naše výsledky nesporný a často rozhodující význam tvorby α toxinu pro infekci pokusných zvířat.

Prozatím nelze rozhodnout, zda v dřívějších údajích o choroboplodnosti stafylokoků tvořících koagulázu (Smith, Hale a Smith 1947) se prokazuje skutečně význam tvorby koagulázy, nebo zda se uplatňuje současně přítomný shlukovací faktor. Zvláště proto, že ani Lack a Wailing (1954), ani my jsme nemohli potvrdit údaj o zvýšení choroboplodnosti stafylokoků pro myšku při současném vstříknutí koagulovatelného plasmatu. Nízkou choroboplodnost pro myšku lze daleko lépe vysvětlit poměrně malou vnímavostí myšek k letálnímu účinku stafylokokového toxinu. Pro povrchový charakter shlukovacího faktoru a jeho vztah k analogickým látkám u streptokoků skupiny A (Duthie 1955) je pravděpodobné, že spíše shlukovací faktor a nikoliv vlastní koaguláza odpovídá za uváděnou odolnost patogenních stafylokoků k fagocytose a jejich schopnost přežít uvnitř leukocytů (Hale a Smith 1945, Rogers a Tompsett 1952, Tompsett 1954).

Shlukovací faktor je antigen buněčný a je z větší části zachován při usmrcení mikrobů formolem nebo zahřátím, jak jsme zjistili v jiných pokusech. Jeho význam pro choroboplodnost stafylokoků ukazuje na možnost jeho úlohy při vytváření alespoň některých forem protistafylokokové imunity.

Souhrn

1. Pokusili jsme se zhodnotit význam t. zv. shlukovacího faktoru pro vznik a průběh stafylokokové infekce. Infekci jsme prováděli kmeny tvořícími koagu-

ласу, toxin a ostatní činitele stafylokokové choroboplodnosti, avšak lišícími se v tvorbě shlukovacího faktoru.

2. Při intraperitoneální infekci bílých myšek jsme zjistili, že velikost smrtelné dávky souvisí jednak s tvorbou α toxinu, jednak s přítomností shlukovacího faktoru.

3. Při intradermální infekci králíků jsme zjistili, že mikroby tvořící shlukovací faktor vyvolávají na rozdíl od kmenů bez této látky zánětlivé reakce delšího trvání, přetrvávají v nich déle a ve větším počtu a zachovávají více a déle než kmeny bez shlukovacího faktoru v infikovaném organismu svoje toxigenní vlastnosti.

4. Z výsledků vyplývá, že shlukovací faktor má význam pro některé formy stafylokokové infekce u pokusných zvířat.

Za technickou spolupráci děkuji M. Buriánové.

L i t e r a t u r a

- Boake, W. C.: *Antistaphylocoagulase in experimental staphylococcal infection*. J. Immunol. 76 : 89, 1956.
Cadness-Graves, B., Williams, R., Harper, G. J., Miles, A. A.: *Slide test for coagulase positive staphylococci*. Lancet I : 736, 1943.
Duthie, E. S.: *Evidence for two forms of staphylococcal coagulase*. J. Gen. Microbiol. 10 : 427, 1954.
Duthie, E. S.: *The action of fibrinogen on certain pathogenic cocci*. J. Gen. Microbiol. 13 : 383, 1955.
Gillespie, W. A., Adler, V. G.: *Production of opacity in egg-yolk media by coagulase positive staphylococci*. J. Path. Bact. 64 : 187, 1952.
Hale, J. H., Smith, W.: *The influence of coagulase on the phagocytosis of Staphylococci*. Brit. J. Exp. Path. 26 : 209, 1945.
Johanovský, J.: *Reaktivita organismu při infekci a intoxikaci*. Rozpravy ČSAV, Praha 1956a.
Johanovský, J.: *Význam sensibilisace v pathogenese stafylokokové infekce*. Přednáška na III. alergologickém kongresu, Florencie 1956b.
Johanovský, J.: *Význam stafylokokového α toxinu a leukocidinu*. Čs. mikrobiol. 2 : 15, 1957.
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.
Lukeš, J., Wagner, V.: *Precipitace stafylotoxinu v agaru a aglutinace kultur antistafylotoxinem*. Čs. hyg. epid. mikr. 3 : 268, 1954.
Rogers, D. E., Tompsett, R.: *The survival of Staphylococci within human leucocytes*. J. Exp. Med. 95 : 209, 1952.
Selbie, F. R., Simon, 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.
Smith, W., Hale, J. H., Smith M. M.: *The role of coagulase in staphylococcal infections*. Brit. J. Exp. Path. 28 : 57, 1947.
Tompsett, R.: *The survival of Staphylococci within phagocytic cells*. Bull. N. Y. Acad. Sci. 30 : 480, 1954.

Значение хлопьеобразующего фактора (clumping factor) для патогенности стафилококков

Ю. Погановский

Р е з ю м е

Был произведен опыт оценки значения т. н. хлопьеобразующего фактора (clumping factor = slide test for coagulase) для возникновения и течения стафилококковой инфекции. Инфекция вызывалась целым рядом штаммов, образующих коагулазу, токсин и остальные факторы патогенности стафилококков, но отличающихся друг от друга по образованию фактора выпадения хлопьев. При внутрибрюшной инфекции белых мышей было установлено, что смертность (величина смертельной дозы) зависит как от выделения альфа-токсина, так и от наличия хлопьеобразующего фактора. При заражении кроликов в кожу было отмечено, что микроорганизмы, выделяющие хлопьеобразующий фактор (в отличие от штаммов, не выделяющих этого вещества): 1. вызывают более длительную воспалительную реакцию, 2. сохраняются в воспаленной ткани дольше и в большем количестве, 3. после пассажа in vivo образуют сравнительно большее количество альфа-токсина и дельта-лизина. Из результатов опытов вытекает, что хлопьеобразующий фактор имеет определенное значение для некоторых форм стафилококковых инфекций у лабораторных животных.

The Significance of the Clumping Factor for the Pathogenicity of *Staphylococci*

J. Johanovský

S u m m a r y

Experiments were carried out for evaluating the importance of the clumping factor in the development and course of staphylococcal infection. Infection was produced using a series of strains forming coagulase, toxin and the other factors of staphylococcal pathogenicity, but differing in the formation of the clumping factor. In intraperitoneal infection in white mice it was found that the size of the lethal dose depended on the formation of alpha toxin and on the presence of the clumping factor. In intradermal infection in rabbits it was found that the micro-organisms forming the clumping factor, as compared with strains in which it is absent, produced inflammatory reactions of longer duration, persisted in these for a longer period and in greater numbers and after passaging in vivo formed a relatively larger amount of alpha toxin and delta lysin: strains without the clumping factor did not develop it. The results demonstrate that the clumping factor is of significance for some forms of staphylococcal infection in experimental animals.

Československá
M I K R O B I O L O G I E

ročník 2. (1957) — č. 2

Přenos tvorby protilátek buňkami polymorfonukleárního exsudátu

JAROSLAV ŠTERZL

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 16. 10. 1956

V dřívějších pracích jsme prokázali u hyperimunizovaných zvířat, že z buněk polymorfonukleárního exsudátu několikrát promytých bylo možno extrahovat mrazením a táním bílkoviny, které se vázaly se specifickým antigenem. Charakter těchto bílkovin nebyl plně totožný se serovými protilátkami, byla-li sledována rychlost pohybu elektroforeticky za různých pH. Po imunisaci jednou dávkou antigenu jsme protilátky v polymorfonukleárech prokazovali jen v krátkém časovém období po imunisaci — za 6 dní (Šterzl 1952, 1954).

V posledních pracích zjišťujeme přítomnost vytvářejících se protilátek v tkáních jejich přenosem na neimunizované příjemce, kteří nereagují sami na antigen tvorbou protilátek (zvířata ozářená X-paprsky, pětidenní králíci mláďata — Šterzl 1955). V této práci používáme stejného postupu k revisi dřívějších výsledků, ze kterých jsme usuzovali na tvorbu protilátek i v buňkách polymorfonukleárního exsudátu.

Materiál a metody

Polymorfonukleární exsudát připravujeme náplní normálních a imunizovaných králíků 300–400 ml fyziologického roztoku intraperitoneálně. Za 4–5 hodin po náplni vypouštíme exsudát a buňky sedimentujeme centrifugací při 500 obr./min. Buněčný sediment propíráme třikrát želatinovým fyziologickým roztokem. Počet buněk je během propírání upraven přibližně podle zákalu na 20–30 tisíc v μ l, potom přesně stanoven počítáním v Bürkerově komůrce. U každého exsudátu děláme nátěr a diferenciální rozpočet ze 100 buněk. Přesně jsou určeny polymorfonukleáry a typické lymfocyty; ostatní buňky peritoneálního exsudátu vzhledem k nesnadné přesné diferenciaci shrnujeme do jedné skupiny jako makrofágy. Po čtyřhodinové peritoneální náplni králíků máme v exsudátu průměrně pouze 5–20 % jiných buněk než polymorfonukleárů. Jako dárců jsme použili dospělých králíků (2–3 kg), které jsme imunizovali *Salm. paratyphi B.* inaktivovanou teplem 1 hod. při 70 °C i. v. Počet dávek a intervalů mezi dávkami je přesně popsán u jednotlivých obrázků. V pokusech, v kterých jsme isolovali buňky z neimunizovaných zvířat a smísili s antigenem in vitro, jsme rovněž použili antigenu paratyfového. Množství slezinových buněk v pokuse a množství antigenu přidávaného k buňkám in vitro je stejné jako v práci již publikované (Šterzl 1957). Přesně jsou však tyto údaje uvedeny i u jednotlivých pokusů v popise k obrázkům.

Serum, jehož jsme použili k adsorpci na buňky peritoneálního exsudátu a pro pokusy s pasivním přenosem protilátek králíčím mláďatům, bylo králíčí serum získané imunisací stejným kmenem *Salm. paratyphi B.*, jehož jsme použili jako antigenu. Titr sera 1 : 400 nebyl nižší než titer protilátek v seru kteréhokoliv z dárců, od nichž byly získány z peritoneálního exsudátu buňky.

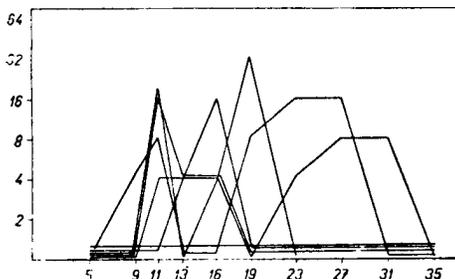
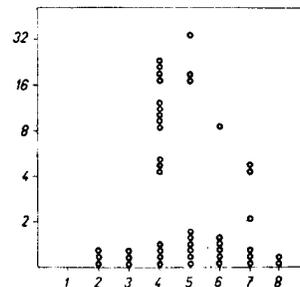
Proprané a na uvedený počet koncentrované buňky byly přeneseny intraperitoneálně 5 dní starým králíčkům, kterým byla odebírána krev kardiální punkcí. Intervaly odběrů jsou zřejmé z jednotlivých obrázků. Přesný metodický postup při stanovení protilátek u králíčích mláďat jsme již popsali (Šterzl 1955). Aglutinace byly uloženy v lednici a odečítány za 4 a 6 dní.

Výsledky

Přenos buněk polymorfonukleárního exsudátu získaných z králíků v různých časových intervalech po imunisaci jednou dávkou antigenu

Celkem jsme provedli 11 pokusů s přenosem na 57 mláďat z 11 vrhů. Králíci byli imunisováni 1 ml bakteriálního antigenu i. v. a byl u nich vyvolán peritoneální exsudát v různém časovém období po imunisaci. Ke každému pokusu jsme použili vždy zvláštní dárce. Exsudáty jsme připravili u králíků po 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 dnech

Obr. 1. Tvorba protilátek po přenosu na mláďata buňkami peritoneálního exsudátu dárce (králíka) imunisovaného jednou dávkou antigenu (10^8 mikrobů). Osa x: dny po imunisaci, kdy byl vyvolán peritoneální exsudát a získány buňky. Každý příjemce je vyznačen jedním bodem. Osa y: hodnoty protilátek; jsou zaznamenány vždy nejvyšší titry protilátek dosažené během 10 dní po přenosu. Záznamy jsou jen u těch zvířat, která přežila a z nichž jsou všechny odběry krve.



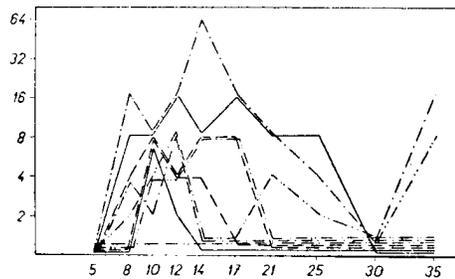
Obr. 2. Normální králík imunisován 1 ml (10^8 mikrobů) 4 dny před vytvořením peritoneálního exsudátu 400 ml fyziologického roztoku. Exsudát po 5 hodinách punkcí vypuštěn a zcentrifugován. Exsudátová tekutina zbavená buněk lyofilisována (120 ml) a rozpuštěna v 6 ml. Aglutinační titr koncentrované exsudátové tekutiny 1 : 16, serum králíka 1 : 64. Buňky promyty a 1 ml ($228 \cdot 10^6$ buněk) injikován králíčatům i. p. Proveden extrakt buněk mražením a táním, aglutinační reakce extraktu negativní. Rozpočet buněk: polymorfonukleáry 82, lymfocyty 17, makrofágy 1. Osa x: stáří králíčat ve dnech, osa y: titr protilátek.

od počátku imunisace. Přehled výsledků přenosu buněk polymorfonukleárních exsudátů je na obrázku 1. Ukazuje se, že nejčastějšího pozitivního průkazu protilátek jsme dosáhli přenesením buněk peritoneálního exsudátu izolovaného z králíků 4 a 5 dní po imunisaci. Průběh tvorby protilátek přenosem buněk odebraných z králíka 4 dny po imunisaci je na obrázku 2. Srovnáváme-li výsledky s těmi, které dosahujeme přenosem buněk sleziny (Šterzl 1955, 1957), jde v současných pokusech přenosem buněk polymorfonukleárního exsudátu o tvorbu méně pravidelnou a časově velmi omezenou.

Přenos buněk polymorfonukleárního exsudátu získaných z opakovaně imunisovaných a revakcinovaných zvířat

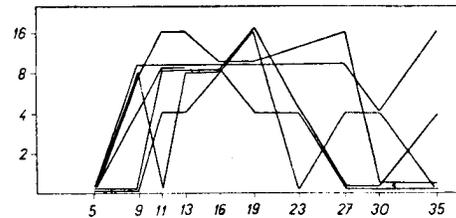
Ve čtyřech pokusech jsme jako dárce použili králíků, kteří byli několikrát opakovaně imunisováni. Přenos byl uskutečněn na 32 králíčích mláďatech. Na obrázcích je v jednom případě (obr. 3) uveden příklad přenosu buněk z revakcinovaného zvířete, obr. 4 ukazuje výsledek přenosu buněk z opakovaně intenzivně imunisovaného dárce. Imunisační dávky jsou uvedeny v popisu k obrázkům. V těchto pokusech, při srovnání s imunisací jednou dávkou, bylo nápadné zvýšení intenzity tvorby proti-

látek u příjemců, její delší trvání a standardnost. Zvláště nápadná je intenzivní a uniformní tvorba protilátek při přenosu buněk z opakovaně intenzivně imunizovaného dárcce. Srovnání rozpočtu buněk peritoneálních exsudátů jednou a několikrát imunizovaných zvířat ukazuje, že intenzivní tvorbu protilátek v těchto posledních pokusech nelze vysvětlit jiným procentuálním zastoupením typů buněk v peritoneálním exsudátu.



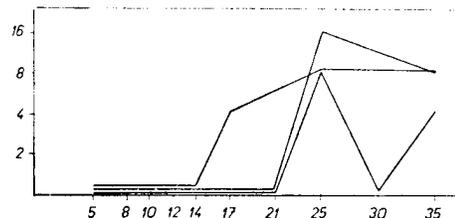
Obr. 3. Králíci č. 801, 802, 803, 804, narození 7. XII. 1954, injikování 5. den života nukleoproteidovými frakcemi; 12. IV. 1955 revakcinováni 1 ml *Salmonella paratyphi B* i. v. (10^7 mikrobů), 9. V. 1955 1 ml ($2 \cdot 10^9$ mikrobů); 10. V. 1955 provedena náplň králíků fyziologickým roztokem, buňky po promytí injikovány králíkatům v množství 1 ml ($40 \cdot 10^6$ buněk). Rozpočet buněk exsudátu z králíka č. 801: polymorfonukleáry 88, lymfocyty 6, makrofágy 6; — č. 802: polymorfonukleáry 91, lymfocyty 9, makrofágy 0; — č. 803: polymorfonukleáry 90, lymfocyty 8, makrofágy 2; — č. 804: polymorfonukleáry 82, lymfocyty 8, makrofágy 10. — Králíkatům č. 201 a 202 injikován 1 ml leukocytů dárcce č. 801 — plně, č. 205 a 206 leukocyty dárcce č. 804 — čerchovaně, č. 207 a 208 leukocyty č. 802 — čárka dvě tečky, kontrola bez vpichu — dvě čárky, dvě tečky. Osa x: stáří králíkat ve dnech, osa y: titer protilátek.

Obr. 4. Králík č. 42 imunizován od 30. 9. 1955 do 30. 1. 1956 třikrát týdně. Nejprve sedmi dávkami suspense 10^8 mikronů v ml, dále 20 dávkami $2 \cdot 10^9$ mikrobů v ml. 3 dny po poslední injekci udělán peritoneální exsudát náplní 400 ml fyziologického roztoku. Po 5 hod. exsudát vypuštěn a buňky odcentrifugovány. Supernatantní tekutina (80 ml) vysušena lyofilisací, rozpuštěna 5 ml destilované vody a dialyzována proti fyziologickému roztoku. Aglutinace v koncentrované tekutině negativní. 1 ml promyté suspence buněk ($24 \cdot 10^6$ buněk) injikován 5 dní starým králíkatům i. p. Diferenciální počet: polymorfonukleáry 82, lymfocyty 6, makrofágy 12. Osa x: dny života králíčete a odběry krve, osa y: titer protilátek v krvi mládat.



Přenos buněk polymorfonukleárního exsudátu neimunizovaných zvířat po smíšení s antigenem in vitro

Provedli jsme celkem 6 pokusů s přenosem na 40 mládat. Vycházeli jsme ze zkušenosti, že smísíme-li s antigenem in vitro buňky, které mají schopnost měnit svůj



Obr. 5. Normální králík naplněn 500 ml fyziologického roztoku. Buňky exsudátu pětkrát promyty fyziologickým roztokem. V 1 ml $228 \cdot 10^5$ buněk. Po proprání buňky smíšeny s antigenem, na jednu buňku exsudátu 2 mikroby *Salmonella paratyphi B*. Směs injikována i. p. králíkatům. Osa x: dny života králíčete a odběry krve, osa y: titer protilátek v krvi mládat.

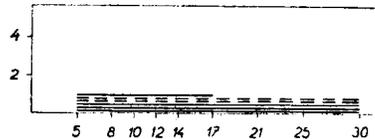
metabolismus (na příklad buňky sleziny), mohou tyto po přenosu intraperitoneálně mládatům vytvořit protilátky (Šterzl 1957). Isolovali jsme proto buňky peritoneálního exsudátu normálních zvířat, smísili jsme je s antigenem a přenesli intraperito-

neálně králičím mládatům. Ani v jednom z pokusů jsme nezjistili tvorbu protilátek v prvním období po přenosu. Záznam jedné skupiny (obr. 5) ukazuje, že prokážeme protilátky teprve v době, kdy mláďata sama aktivně reagují na antigen.

Přenos leukocytů neimunizovaných zvířat inkubovaných in vitro s imunním serem

Je-li přenos tvorby protilátek buňkami polymorfonukleárního exsudátu skutečná tvorba, anebo jsou-li serové protilátky na buňky pouze adsorbovány, snažili jsme se zodpovědět již v dřívějších pokusech (Šterzl 1952). V nynějších pokusech, ve kterých používáme k průkazu tvorby protilátek přenosu buněk, jsme provedli kontrolní pokusy stejnou metodou. Adsorbujeme na izolované buňky peritoneálního exsudátu známé množství serových protilátek, buňky propíráme třikrát želatínovým fyziologickým roztokem a přenášíme intraperitoneálně mládatům. Provedli jsme celkem 3 pokusy přenosem na 25 mládat. V žádném případě jsme nezjistili protilátky ani u mládat, ani v extraktech leukocytů. Podrobný popis jednoho z provedených

Obr. 6. Normální králík naplněn 450 ml fyziologického roztoku, exsudát vypuštěn po 5 hodinách. Diferenciální rozpočet: polymorfonukleáry 86, lymfocyty 10, makrofágy 4. Po promytí v 1 ml $183 \cdot 10^6$ buněk. Buňky přeneseny 2 mládatům — čárkovaně. Zbytek centrifugován a suspendován do stejného objemu imunního sera proti *Salmonella paratyphi B*, titer 1 : 400. Inkubace se serem 30 min. při 37° za otáčení 30 obr./min. Po inkubaci serum odstraněno a zjišťován v něm znovu titer protilátek, který se nezměnil. Sedimentované buňky třikrát proprány a suspendovány do výchozího množství tekutiny. Počet buněk v 1 ml $176 \cdot 10^6$, 1 ml buněk injikován i. p. králičím mládatům — značeno plně. Z 2 ml suspence leukocytů udělán extrakt mrazením a táním; aglutinační reakce extraktu negativní.



pokusů je u obrázku 6. Rovněž jsme nezjistili po inkubaci buněk se serem známého titru snížení titru protilátek, t. j. vysycování buňkami. Negativní průkaz protilátek při přenosu je pochopitelný, když jsme nezjistili protilátky ani přímo aglutinačně v extraktu buněk; pasivní přenos sera uvedeného titru 1 : 400 dokazujeme v seru mládat tehdy, je-li injikován 1 ml koncentrovaného sera a zředěného 1 : 10. Po vpravení 1 ml sera ředěného 1 : 100 již protilátky v krvi mláďate serologicky pravidelně neprokazujeme. Je proto možno uzavřít, že zůstane-li na polymorfonukleárních leukocytech adsorbováno nějaké nepatrné množství již hotových protilátek, potom tyto protilátky po přenosu na mláďata serologicky v jejich krvi nelze prokázat.

Bylo by však možné, že i serologicky prokazatelné množství protilátek, které se adsorbovalo na buňky, se dostává během přípravy extraktu mrazením a táním do vazby s některými komponentami buněk a ztrácí serologickou účinnost. V tom případě bychom protilátky, ačkoliv by byly přítomny, serologicky neprokazovali. Tuto možnost jsme ověřili smíšením centrifugované suspence buněk (v 1 ml $30 \cdot 10^6$ buněk), získaných z králičího exsudátu, se stejným objemem sera uvedeného titru. Část buněk jsme rozrušili mrazením a táním ihned po smíšení se serem, část po inkubaci 37 °C po dobu 30 minut. Titr protilátek v seru se nezměnil ani prostou inkubací, ani tím, že jsme buňky s protilátkami smísili a rozrušili. Tím dokazujeme, že buněčné komponenty se neváží se serovými protilátkami tak, aby maskovaly jejich serologickou aktivitu.

Z těchto kontrolních pokusů uzavíráme, že předchozími pokusy zjištěná tvorba protilátek po přenosu buněk polymorfonukleárního exsudátu mládatům je výrazem biologické aktivity buněk a nepředstavuje pasivní přenos již vytvořených protilátek.

Diskuse

Literárně jsme otázku tvorby protilátek a spojení s určitými typy buněk přehlédli již v dřívější publikaci (Šterzl 1954, str. 45—51). Ukázali jsme, že řada autorů spojuje tvorbu protilátek jen s určitými typy buněk. V poslední době, především od prací severských autorů (Bjerneboe, Gormsen a Lungquist 1947, Fagraeusová 1948) a práce Ehrichovy (1949), považují někteří za hlavní místo tvorby protilátek buňky plasmatické (na př. Coons a sp. 1955, Foršter 1955). Avšak jiné experimentální výsledky svědčí o tom, že tvorby protilátek se účastní i další buněčné typy (Girard a Murray 1954, Roberts a Dixon 1955, Sinkovics 1955, Stoner a Hale 1955).

Velmi malá pozornost se věnuje nejen v úvahách, ale i experimentálně účasti fagocytujících buněk při tvorbě protilátek. Pokud se sleduje jejich účast v tvorbě protilátek, vychází se z předpokladu uvedeného Ehrichem, Harrisem a Mertensem (1946), že fagocytující buňky se účastní pouze pohlcení a natrávení antigenu jako přípravy pro buňky skutečně výkonné, lymfocyty a plasmacyty. Protože však Walsh a Smith (1951) i Roberts (1955) prokázali, že antigen natrávený fagocyty snižuje protilátkovou reakci, domnívají se, že se neúčastní tvorby protilátek. Jako další důkaz mají sloužit i provedené pokusy (Ehrich a spol. 1946, Roberts 1955), že fagocytující buňky, které vycestovaly do kožního nebo peritoneálního zánětu a ke kterým byl potom vpraven antigen, netvoří protilátky. Je možno předpokládat, že vyzrálé fagocytující buňky, které vcestují do uměle vyvolaného zánětu, nejsou schopny reagovat tvorbou protilátek. To prokazujeme i ve svých pokusech, v nichž jsme izolovali buňky exsudátu, smísili s antigenem a vpravili králíčím mládatům. Ani v jednom z těchto pokusů jsme neprokázali tvorbu protilátek. Naopak jsme však protilátky přenesli stejnými typy buněk exsudátu tehdy, byly-li odebrány 4 a 5 dní po imunisaci. Domníváme se, že tyto pokusy potvrzují náš předpoklad, že buňky mesenchymu mohou měnit svůj metabolismus tehdy, setkají-li se s antigenem nikoliv již ve vyzrálém stavu, ale v době svého vývoje.

Zvláště je třeba posoudit, zda přenos tvorby protilátek na mláďata se uskutečňuje polymorfonukleárními buňkami, nebo jsou-li za tvorbu protilátek odpovědny jiné typy buněk, obsažené v exsudátu v malém množství. K přenosům jsme použili množství 20. 10⁶—30. 10⁶ buněk, což je nejmenší množství, které se nám osvědčilo při přenosu velmi výkonných buněk sleziny. Je to množství několikanásobně menší, než kterého používá k přenosům Harris (1954), který má nejmenší množství buněk 150. 10⁶. Protože přenos tvorby protilátek přímo závisí na množství přenášených buněk, je málo pravděpodobné, že by se procentuálně malé množství lymfocytů a makrofágů mohlo účastnit v protilátkové reakci. K definitivnímu závěru je však třeba sledovat i morfologický osud jednotlivých typů přenesených buněk, zda se v příjemci rozmnožováním jednoho typu buněk nemění poměry stanovené rozpočtem v nátěru.

Dosažené výsledky jsou nám znovu podnětem, abychom posuzovali tvorbu protilátek jako metabolickou změnu různých buněk a tkání. Zvláště významná je metabolická změna během imunisace u takových buněk jako jsou polymorfonukleáry, které se podstatně a přímo účastní obranných pochodů v organismu.

Souhrn

V práci zjišťujeme, zda je možno přenést tvorbu protilátek z dospělých imunizovaných králíků buňkami polymorfonukleárního exsudátu na 5 dní stará králíčata.

Po jedné imunisační dávce antigenu (10⁸ mikrobů *Salmonella paratyphi B*) bylo možno přenést tvorbu protilátek buňkami polymorfonukleárního exsudátu mlá-

datům pouze tehdy, byly-li buňky získány z exsudátu nejdříve 4 dny po imunisaci. Tvorba protilátek u mládat vyvolaná buňkami dárce imunisovaného jednou dávkou je krátkodobá a nestandardní.

Buňky polymorfonukleárního exsudátu získané z dospělých dárců, imunisovaných opakovaně několika dávkami antigenu, vyvolávají u mládat tvorbu protilátek vyšší, déle trvající a standardnější než po přenosu buněk z dárců, imunisovaných jednou dávkou antigenu.

Buňky polymorfonukleárního exsudátu získané z normálních neimunisovaných králíků a smíšené s antigenem in vitro po přenosu intraperitoneálně králíčím mládatům protilátky nikdy nevytvářejí.

Neprokázali jsme adsorpci protilátek na polymorfonukleární leukocyty ani příjmy serologickými testy, ani přenosem buněk na králíčí mládata.

Z pokusů uzavíráme, že rovněž buňky polymorfonukleárního exsudátu jsou zúčastněny na imunitní přestavbě organismu, ale to pouze ty buňky, které se setkaly s antigenem v průběhu svého vývoje, nikoliv již dozrálé buňky polymorfonukleárního exsudátu.

Literatura

- Bjorneboe, M., Gormsen, H., Lundquist, F.: *Further experimental studies on the role of plasma cells as antibody producers*. J. Immunol. 55 : 121, 1947.
- Coons, A. H., Leduc, E. H., Connolly, J. M.: *Studies on antibody production. I. Method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit*. J. Exp. Med. 102 : 49, 1955.
- Ehrich, W. E., Harris, T. N., Mertens, E.: *The absence of antibody in the macrophages during maximum antibody formation*. J. Exp. Med. 83 : 373, 1946.
- Ehrich, W. E., Drabkin, D. L., Forman, C.: *Nucleic acid and production of antibodies by plasma cells*. J. Exp. Med. 90 : 157, 1949.
- Ehrich, W. E.: *Cellular sources of antibodies. Blood cells and plasma proteins*. New York 1953 (str. 187).
- Fagraeus, A.: *Antibody production in relation to the development of plasma cells*. Acta med. scand. Suppl. 204, 1948.
- Foršter, F. K.: *K voprosu o mechanizme obrazovanija antitel limfoidnymi kletkami*. ŽMEI (11) : 100, 1955.
- Girard, K. F., Murray, E. G. D.: *The presence of antibody in macrophage extracts*. Canad. J. Biochem. Physiol. 32 : 14, 1954.
- Harris, S., Harris, T. N., Farber, M. B.: *Studies on the transfer of lymph node cells. I. Appearance of antibody in recipients of cells from donor rabbits injected with antigen*. J. Immunol. 72 : 148, 1954.
- Roberts, K. B.: *The failure of macrophages to produce antibodies*. Brit. J. Exp. Pathol. 36 : 199, 1955.
- 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.
- Sinkovics, J.: *Virus neutralisation experiments with lymphoid cell and lymph node extracts*. Acta microbiol. 2 : 385, 1955.
- Stoner, R. D., Hale, W. M.: *Antibody production by thymus and peyr's patches intraocular transplants*. J. Immunol. 75 : 203, 1955.
- Šterzl, J.: *Průkaz normálních a imunních globulinů v leukocytech zvířat imunisovaných bílkovinami*. Čs. biologie 1 : 285, 1952.
- Šterzl, J.: *Obranné pochody v organismu. Mesenchymální tkáň při infekci a imunisaci*. Praha, 1954.
- Šterzl, J.: *Průkaz a biologické vlastnosti prekursoru serových protilátek*. Čs. biologie 4 : 600, 1955.
- Šterzl, J.: *Tvorba protilátek izolovanými buňkami sleziny po smíšení s antigenem in vitro*. Čs. mikrobiol. 2 : 1, 1957.
- Walsh, T. E., Smith, C.: *The influence of polymorphonuclear leucocytes and macrophages on antibody production*. J. Immunol. 66 : 303, 1951.

Перенесение образования антител клетками полиморфонуклеарного экссудата

Я. Штерцль

Р е з ю м е

В своей работе мы определяли, возможно ли с помощью клеток полиморфонуклеарного экссудата перенести способность к образованию антител от взрослых иммунизированных кроликов на 5-дневных крольчат. После однократной иммунизирующей дозы антигена (10^8 микробов *Salmonella paratyphi B*) удавалось передать крольчатам эту способность клетками полиморфонуклеарного экссудата только в случае, если эти клетки были получены из экссудата, вызванного не раньше чем через 4 дня после иммунизации. Способность к образованию антител, вызываемая у молодых животных клетками донора, иммунизированного однократной дозой, оказывается нестандартной и скоропреходящей. Клетки полиморфонуклеарного экссудата, полученного от взрослых доноров, повторно иммунизовавшихся несколькими дозами антигена, вызывают у молодых животных более интенсивное, более длительное и более стандартное образование антител, чем перенос клеток от доноров, иммунизированных одной дозой антигена. Клетки полиморфонуклеарного экссудата, полученные от нормальных, не иммунизированных кроликов и смешанные с антигеном *in vitro*, после переноса в полость брюшины крольчатам ни в одном случае не вызвали образования антител. Наличие адсорбции антител на полиморфонуклеарные лейкоциты не было нами доказано ни путем прямых серологических тестов, ни путем переноса клеток крольчатам. Из опытов мы делаем заключение, что и клетки полиморфонуклеарного экссудата принимают участие в перестройке организма в направлении иммунитета, но это бывают только те клетки, которые столкнулись с антигеном в процессе своего развития, а не сформировавшиеся уже клетки полиморфонуклеарного экссудата.

The Transfer of Antibody Formation by Means of the Cells
of Polymorphonuclear Exudate

J. Šterzl

S u m m a r y

The communication investigates the possibilities of transferring antibody formation from adult immunised rabbits to five-day-old rabbits by means of the cells of a polymorphonuclear exudate. Following a single immunisation dose of the antigen (10^8 microorganisms of *Salmonella paratyphi B*), antibody formation was transferred to young rabbits via the cells of a polymorphonuclear exudate only if the cells were transferred from the exudate four days after immunisation at the earliest. Antibody formation produced in young rabbits by the cells of a donor immunised with a single dose was of short duration and not consistent. The cells obtained from the polymorphonuclear exudate of adult donors which had been given several doses of the antigen produced a higher degree of antibody formation in young rabbits, which was also more lasting and more consistent than following the transfer of cells from donors immunised with only one dose of the antigen. The cells of a polymorphonuclear exudate taken from normal, non-immunised rabbits and mixed with the antigen *in vitro* never produced antibody formation when injected intraperitoneally in young rabbits. Adsorption of antibodies on to polymorphonuclear leucocytes was not demonstrated either by direct serological tests or by transfer of the cells to young rabbits. It is concluded that the cells of polymorphonuclear exudate also participate in the formation of antibodies in the organism, but only those cells which come into contact with the antigen in the course of their development, not mature cells of polymorphonuclear exudate.

Československá
M I K R O B I O L O G I E
ročník 2. (1957) č. 2

Imunologické a histologické změny při imunisaci lipoidním adjuvans

MIROSLAV HOLUB

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 5. 9. 1956

Depotní imunisace, a zvláště imunisace s užitím různých směsí minerálních či rostlinných olejů, má nejen rostoucí význam ve veterinární i lidské medicíně (na příklad Salk 1952, Patočka a sp. 1954), ale je také neobyčejně vhodným pokusným postupem pro řešení některých základních imunologických otázek, jako je nespecifická stimulace mesenchymu, změny při dlouhodobé tvorbě protilátek a význam zánětu a různých buněčných typů pro imunitu.

Od roku 1916, kdy si Le Moignic a Pinoy povšimli podpůrného účinku minerálních olejů smíšených s antigenem na tvorbu protilátek, a zejména od základních prací Freundových, v nichž je od roku 1937 analysován účinek lipoidního adjuvans (ve spojení s usmrcenými mykobakteriemi), byly vysloveny o podstatě této imunisace různé závěry, které můžeme shrnout zhruba do tří skupin:

1. Lipoidní nosič, podobně jako nejrůznější cizorodé pevné částice (tapioka, uhelné částičky, mykobakterie, erythrocyty, hydroxyd hlinitý), umožňuje zavlečení antigenu do buněk, produkujících protilátky (Sachs 1929, cit. Hummel 1955).

2. Lipoidní adjuvans má účinek čistě depotní, obleňuje vstřebávání a odbourávání antigenu z místa vstříku. Antigen pak může dlouhodobě působit na buňku tvořící protilátky, ve smyslu Landsteinerovy koncepce z roku 1921 (Fischel a spol. 1952). Případně může dojít k sčítání antigenního dráždění podle Zdrodovského domněnky (Vorobev 1955), nebo ke sčítání a zvýšenému účinku zvolna uvolňovaných dávek antigenu.

3. Lipoidní adjuvans v místě vpichu i na vzdálených místech, kam se dostává lymfatickým a krevním proudem, dráždí tkáň k mohutné zánětlivé reakci. Zánětlivé dráždění zvyšující tvorbu protilátek (Wood 1953) je v zásadě stejné u všech druhů adjuvans i jiných látek vybavujících zánět (chlorid vápenatý, agar, saponin, ale i stafylokokový toxin — Terentev a Stefanova 1954, Janev 1954, Ramon 1955).

Přitom je nutno počítat i s možností tvorby protilátek také v místě reakce, kam byl antigen s dráždícím olejem vstříknut nebo zavlečen (Freund 1947, Freund, Schryver, Mc Guinness a Geitner 1952, Westwater 1940, Fischel a spol. 1952). Místní produkce protilátek může být překryta nahromaděným antigenem.

Freund (1940, 1947, 1948, 1951) shrnuje doklady pro všechny tyto faktory, depotní účinek, ochranu mikrobního antigenu v tukových kapénkách, kde se na př. mykobakteria usazují na povrchu a vyvolávají i aglutinaci kapének, zavlečení kapek i dráždění některou složkou minerálního oleje, který není plně nahraditelný oleji rostlinnými.

Z literárních údajů i s hlediska širší fyziologické koncepce imunitních dějů je zřejmé, že působení lipoidního adjuvans je dáno souborem činitelů, které je nutno analyzovat nejen serologickými, ale i pokusně morfologickými a fyziologickými metodami. Pro začátek jsme si dali za úkol ověřit, jaký je vztah imunisace úplným adjuvans k imunisaci normální nebo k imunisaci, která rozložením dávek antigenu a samostatným působením lipoidní substance účinek úplného adjuvans napodobuje. A dále, jaký je základní histologický obraz působení lipoidního adjuvans v organismu. Zvolili jsme antigen (*Salmonella paratyphi B*) pro jeho vhodné antigenní

vlastnosti. Ostatně právě u salmonel přichází v úvahu adjuvans bez mykobakterií, jak jsme ho použili my: mykobakterie zde nemají podobně jako u shigel podpůrného účinku (Halbert a spol. 1946, cit. White, Coons a Connoly 1955, Freund a spol. 1948).

Materiál a metody

A) *Hladina protilátek*. Šedesát králíků (čičily, samice, o váze 2400–3500 g na počátku pokusu) jsme rozdělili do osmi skupin:

1. Jednadvacet králíků (3 podskupiny po pěti a 2 podskupiny po třech) dostalo úplné lipoidní adjuvans o složení: parafinový olej — 1,5 ml, lanolin — 0,4 ml, sorbit monooleát — 0,1 ml, vodní suspence *Salmonella paratyphi B* (inakt. při 70 °C po dobu 1 hod., obsah 2 · 10⁹ mikrobů v 1 ml) — 1 ml. Emulze vody v tuku byla vytvořena opětovným vtahováním a vytlačováním z injekční stříkačky a jednoduše promícháním v mixeru. Kvalitu emulze jsme ověřili tím, že se její kapka udržela na vodní hladině bez rozptýlení. Tuto emulsi vody v tuku jsme vstříkovali králíkům pod kůži zad, těsně za levou lopatku. Podskupiny byly brány do pokusu postupně.

2. Pět králíků dostalo pouze 1 ml vodní suspence mikrobů (*S. paratyphi B*) o stejné koncentraci, avšak rozdělený do čtrnácti stejných dávek, vstříkovaných každodenně po 14 dní do stejného místa, pod kůži zad, těsně za levou lopatku.

3. Pět králíků dostalo podkožně za levou lopatku 3 ml lipoidního adjuvans popsaného složení, avšak s fyziologickým roztokem místo mikrobiální suspence. Do téhož místa jsme vpravovali každodenně po 14 dní suspensi *S. paratyphi B* stejné koncentrace, v celkovém objemu 1 ml — jako ve skupině 2.

4. Pět králíků dostalo adjuvans jako skupina 3, ale antigen jsme vstříkovali ve čtrnácti denních dávkách za lopatku pravou, tedy na opačnou stranu než bylo ložisko adjuvans.

5. Pět králíků dostalo adjuvans jako skupina 3 a 4 a hned poté, bez vytažení jehly, 1 ml suspence *S. paratyphi B* do ložiska adjuvans za levou lopatku.

6. Pět králíků dostalo adjuvans jako skupina 5, ale 1 ml antigenu podkožně za lopatku pravou.

7. Pět králíků dostalo podkožně za levou lopatku po 2 ml parafinového oleje s lanolinem (1,5 a 0,5 ml). Za 6 dní do téhož místa 1 ml suspence *S. paratyphi B* o udané koncentraci.

8. Devět králíků (2 podskupiny) jsme imunisovali normálně, bez lipoidního adjuvans, podkožním vstříkem 1 ml suspence *S. paratyphi B* o stejné koncentraci, rovněž za levou lopatku.

Krev pro stanovení protilátek aglutinací jsme odebrali z okrajové žíly ucha. Titr protilátek jsme stanovili při uložení do lednice (2–4°) po 2, 4 a 6 dnech. U dvou zvířat ze skupiny 1 a u celé skupiny 7 a 8 jsme odebrali krev a zjišťovali protilátky již od prvního dne po vstříku antigenu, u všech skupin od sedmého dne po imunisaci v týdenních, později čtrnáctidenních až měsíčních intervalech po 1–18 měsíců.

U králíků skupiny 1 byly provedeny také vazby hemolytického komplementu, pozměněné Coombsovy testy na inkompletní protilátky proti bakteriálnímu antigenu (Bürki a Fey 1953, Šterzl 1956; hemaglutinační titr křeččího sera proti králíčím krvinkám 1 : 4096), testy na adsorpci konglutinačního komplementu s kočičím komplementem a hovězím konglutininem (Hole a Coombs 1947). Tyto reakce byly provedeny u pěti skupin po třech králících, a to za 1 týden, 9 týdnů, 10 týdnů a 5 měsíců a 6½ měsíce, 10, 11 a 15 měsíců po imunisaci.

B) *Morfologické změny*. Jednačtyřicet králíků (čičily, samice o váze 2250–3600 g na začátku pokusu) jsme rozdělili do 4 skupin:

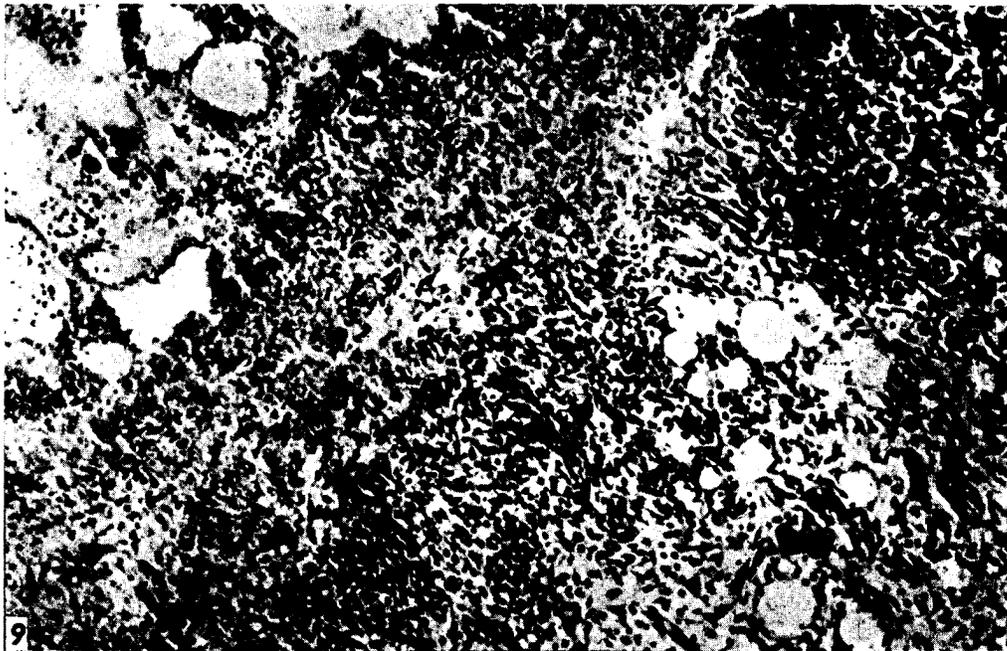
1. Dva a et pět králíků dostalo podkožně, těsně za levou lopatku, lipoidní adjuvans s bakteriálním antigenem, stejně jako skupina 1 v oddílu A. Králíci byli zabiti, zpravidla vzduchovou embolií, hned po vpichu a za 4, 8, 12, 24, 48 hod., 4, 5, 7, 8, 9, 10 dní, za 2, 3, 4, 7 a 9 týdnů a za 3, 4, 7, 9, 16 měsíců po vpichu.

2. Pět králíků dostalo 3 ml lipoidního adjuvans s fyziologickým roztokem místo antigenu. Antigen pak ve čtrnácti dávkách do ložiska adjuvans nebo na opačnou stranu těla jako skupina 3 a 4 v oddíle A. Králíci zabiti za 10 a 14 dní a za 7 měsíců po vstříku adjuvans.

3. Devět králíků bylo normálně imunisováno (1 ml suspence *S. paratyphi B* o obsahu 2 · 10⁹ mikrobů), a to podkožně, těsně za levou lopatku jako skupina 8 v oddíle A. Zvířata zabita za 3, 4, 5, 7, 8, 14 a 21 dní po vpichu vzduchovou embolií.

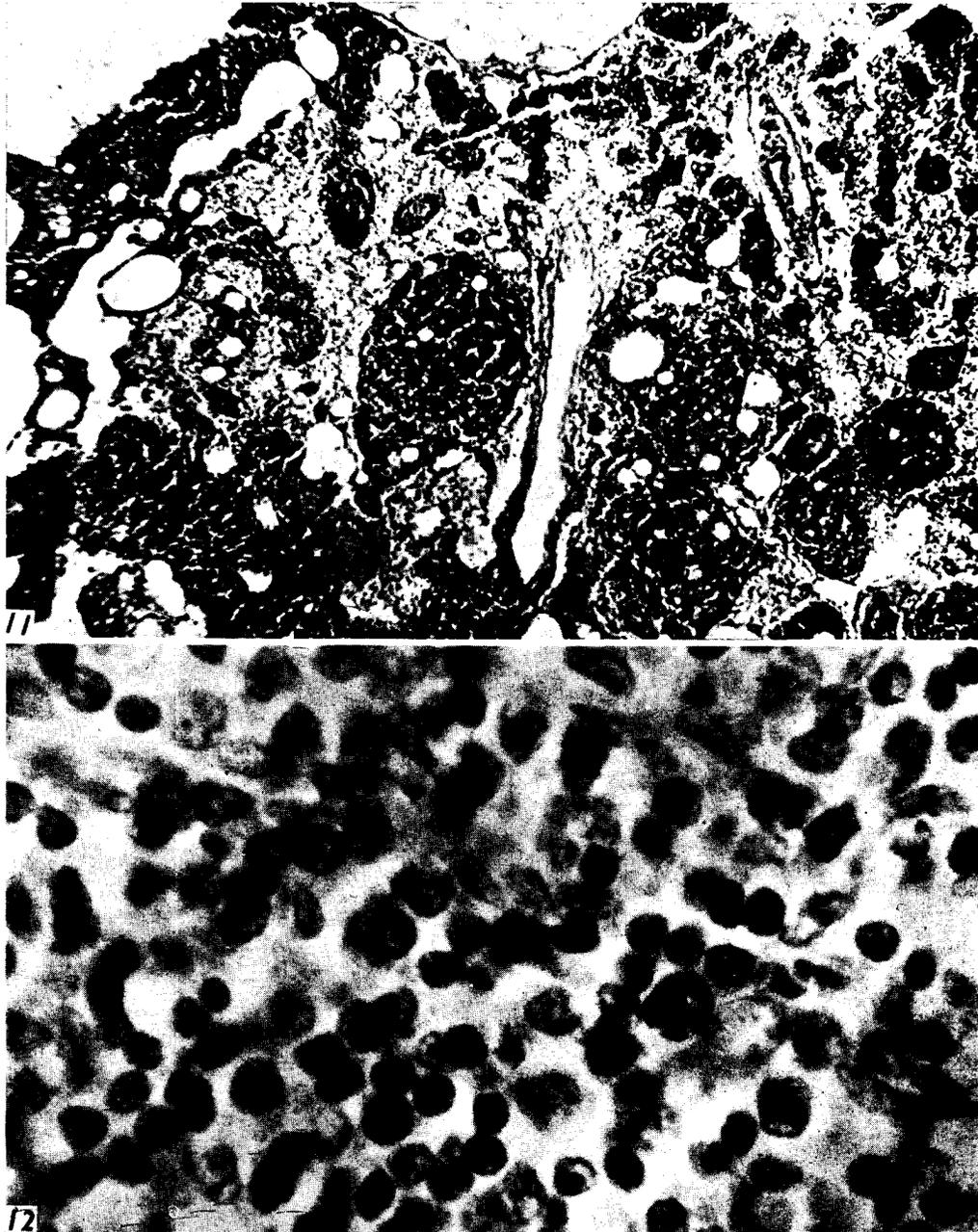
4. Dva králíci dostali jen 2 ml parafinového oleje s lanolinem s. c. (jako skupina 7 v oddíle A) a byli zabiti po šesti dnech.

Králíky všech skupin jsme hned po smrti pitvali a zjistili — kromě celkové váhy — váhu sleziny a nadledvinek. Orgány jsme odebrali pro histologické vyšetření. Parafinové, po případě zmrazení řezy jsme barvili hematoxylinem-eosinem, hematoxylinem-fosforwolframovou kyselinou podle Malloryho, hematoxylinem-pikrofuksinem podle van Giesona, methylovou zelení — pyroninem (Unna-Pappenheim v úpravě Trevan-Sharroekové), metodou PAS (Hotchkiss-McManus), metodou s koloidálním železem podle Haleho, toluidinovou modří a Sudanem III. Při histochemickém stanovení kyselých polysacharidů jsme ověřovali specifčnost reakce natrávením testikulární hyaluronidasou (Hyasa Spofa).



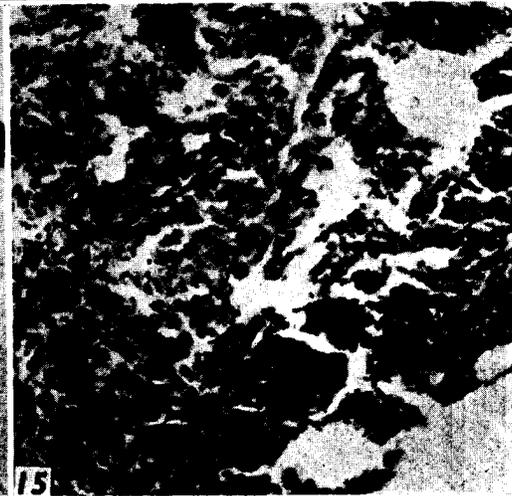
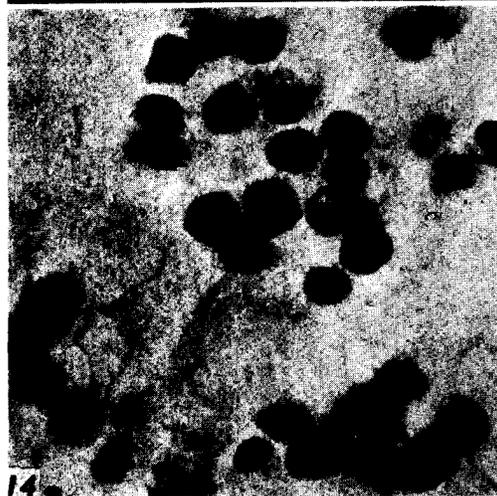
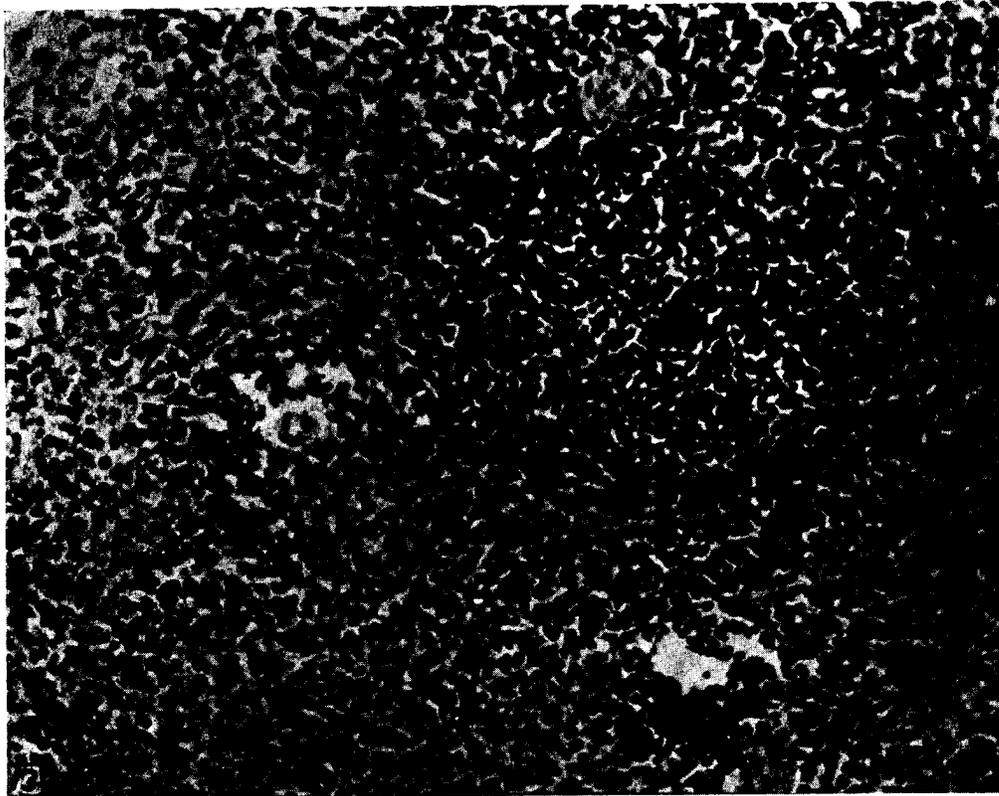
Obr. 9. Granulom z lipoidního adjuvans s antigenem za 8 dní. Vlevo nahoře tukové hmoty, tvořící oka v buněčném detritu a se zbytky polymorfonukleární infiltrace. Zdola sem pronikají zony granulační tkáně s makrofágy, které obklopují a uzavírají tuková oka. Ojediné obrovské buňky, nevelká příměs lymfocytů. Hematoxylin-eosin. Zvětšeno 120 ×.

Obr. 10. Granulom z lipoidního adjuvans s antigenem za 16 měsíců. Systém opouzdřených dutin, v nichž dochází k nové proliferaci makrofágů a granulační tkáně. Vysoká pozitivita PAS v pouzdrech. Difusní infiltrace lymfocytů. PAS-hematoxylin. Zvětšeno 150 ×.



Obr. 11. Uzlina axilární na straně injekce lipidního adjuvans s antigenem, 8 dní po vstříku. Značně dilatované sinusy a eferentní cévy, kapky tuku i v husté lymfatické tkáni. Retikulární buňky a endothelie proliferují, tvoří se ojedinělé obrovské buňky (na př. vlevo uprostřed). Hematoxylin-van Gieson. Zvětšeno 85 \times .

Obr. 12. Uzlina axilární na opačné straně než je ložisko lipidního adjuvans s antigenem, za 7 měsíců po vstříku. V sousedství perifolikulárního splavu lymfocyty, zmnožené polymfocyty a přechody k plasmatickým buňkám. Methylová zeleň-pyronin. Zvětšeno 1500 \times .



Obr. 13. Slezina 7 měsíců po vstřiku lipidního adjuvans s antigenem. Primární a sekundární lymfatický uzlík s naznačenými lemy primitivních retikulárních buněk. Málo snížený obsah lymfocytů, skupiny plasmatických buněk v červené pulpě. Methylová zeleň-pyronin. Zvětšeno 150 \times .

Obr. 14. Skupiny plasmatických buněk zmnožených v tukovém pojivu sinu ledviny, 8 měsíců po vstřiku lipidního adjuvans s antigenem. Hematoxylin-eosin. Zvětšeno 1400 \times .

Obr. 15. Perivaskulární ložisko granulační tkáně v plicích, 3 měsíce po vstřiku lipidního adjuvans s antigenem. Difusně zmnožené makrofágy, ojedinělé plasmatické buňky a lymfocyty, vlevo dole peribronchiální lymfatický uzlík a tvorba drobných syncytiálních útvarů. Hematoxylin-eosin. Zvětšeno 100 \times .

Výsledky

A) *Hladina protilátek.* Aglutinací zjišťované protilátky se objevují nejdříve u králíků, kteří byli imunisováni za 6 dní po vpichu oleje a lanolinu (skup. 7), a to za 2 dny v titru 1 : 4 (u tří králíků), za 4 dny v titru 1 : 64 (čtyři králíci) a 1 : 128 (jeden králík). U normálně podkožně imunisovaných (skupina 8) a u všech ostatních skupin je nástup protilátek pozvolnější a počíná až třetího dne. Při dalším vzestupu protilátek (obr. 1—8) se skupina 1 (úplně lip. adjuvans) statisticky významně odliší

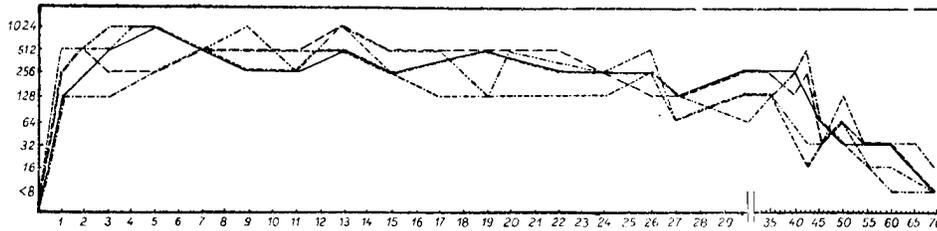
Tab. 1. Porovnání títů protilátek, zjištěných přímou aglutinací, pozměněným Coombsovým testem, testem s absorpcí konglutinačního komplementu (CCAT) a vazbou hemolytického komplementu. Všechna zvířata ze skupiny A 1.

Doba po imunisaci, označení králíka		Aglutinace	Coombsův test	Absorpce konglutinačního komplementu	Vazba hemolytického komplementu
1 týden	167	512	512	1024	64
	340	512	512	512	32
	362	512	512	1024	64
9 týdnů	625	256	4096	nezjišťováno	
	158	512	2048		
	159	512	2048		
10 týdnů	348	512	1024	1024	64
	349	512	2048	1024	
	369	512	1024	512	
5 měsíců	619	512	1024	nezjišťováno	
	623	512	2048		
	687	128	2048		
7 měsíců	625	128	1024	512	128
	158	256	512	512	32
	159	256	2048	2048	64
10 měsíců	619	128	512	256	32
	623	128	2048	256	64
	687	128	1024	256	
11 měsíců	91	64	2048	nezjišťováno	
	533	32	1024		
	528	64	2048		
15 měsíců	91	16	256	512	64
	533	32	512	256	32
	528	32	512	256	32

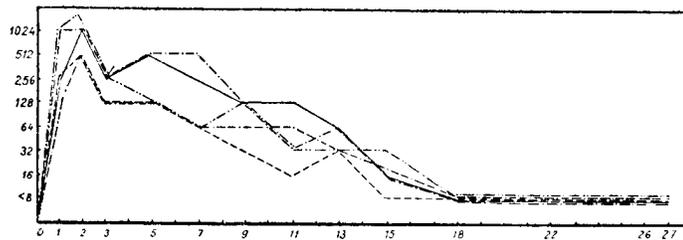
vyššími titry za dva týdny od skupiny 5, za tři a pět týdnů od skupin 5—8, za 7 týdnů i od skupiny 4. Od 9. týdne je rozdíl hladiny protilátek u skupiny 1 proti všem ostatním skupinám statisticky vysoce významný. Skupiny 7 a 8 mají od druhého do pátého týdne významně nižší titry i proti skupinám 2—4 (s opakovaným vpichováním antigenu, s výjimkou skupiny 4 za tři týdny a s výjimkou rozdílu mezi skupinami 3 a 7 za dva týdny). Skupina 5 má významně nižší titry i proti skupině 1—4 za dva a tři týdny a proti skupině 3 za 7 a 9 týdnů. Po osmnácti až dvaadvaceti týdnech

klesají titry protilátek všech skupin kromě 1 na hodnoty trvale nižší než 1 : 8. Ve skupině 1 klesá na tuto hodnotu titer protilátek až po sedmdesáti týdnech. Skupiny jsme navzájem statisticky porovnávali Masseyovým testem pro srovnání dvou výběrových distribučních funkcí.

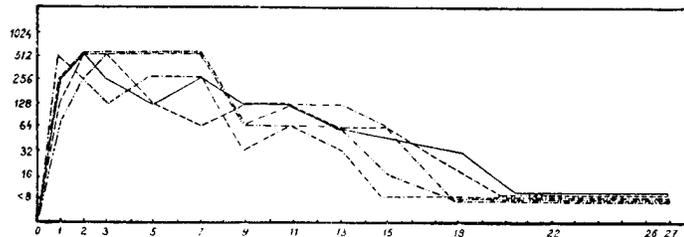
Výsledky ostatních serologických zkoušek jsou v porovnání s titry aglutinací zjišťovaných protilátek sestaveny v tabulce 1.



Obr. 1. Hladina aglutinací zjišťovaných protilátek u pěti králíků s úplným lipidním adjuvans, v němž byla emulgována vodní suspence inakt. *S. paratyphi B*. Osa *x*: čas v týdnech (od třicátého týdne jsou dílky redukovány na pětinu), osa *y*: titer protilátek.



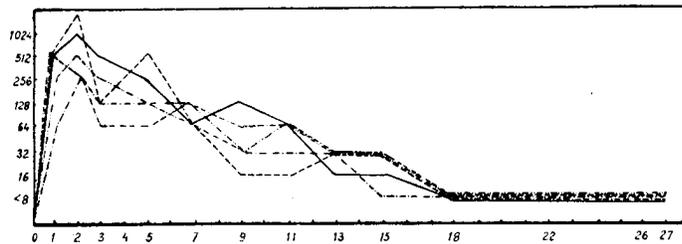
Obr. 2. Hladina aglutinací zjišťovaných protilátek u pěti králíků, kterým byl vstříknut antigen (suspence *S. paratyphi B*) samotný, ve čtrnácti dílčích dávkách s. c. (první vpich v bodě 0).



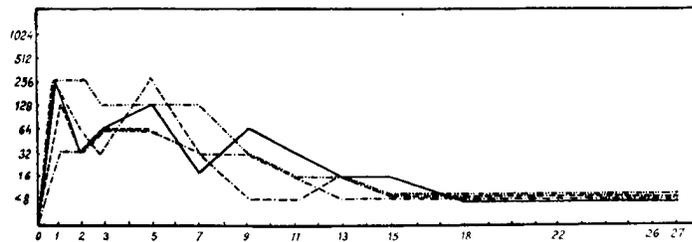
Obr. 3. Hladina protilátek u pěti králíků, kterým bylo vstříknuto samotné lipidní adjuvans a do jeho ložiska, počínaje dnem vstříku adjuvans (bod 0), čtrnácti dílčích dávek antigenu (suspence *S. paratyphi B*)

B) *Morfologické změny.* Pitva ukazuje v místě vstříku úplného lipidního adjuvans prosáknutí podkožního pojiva a hyperemii, s maximem po dvanácti hodinách. Lymfatika jsou až do 4. dne výrazně rozšířena, šíření lipidních hmot směrem do axily je makroskopicky patrné. Za 8 hodin lze pozorovat fibrinový exsudát, po 24 hod. se rosolovitá hmota adjuvans již nedá setřít, po dvou dnech je polotekuté centrum obdáno tužším bělavým valem. Ložisko se někdy — podle způsobu vstříku — počíná

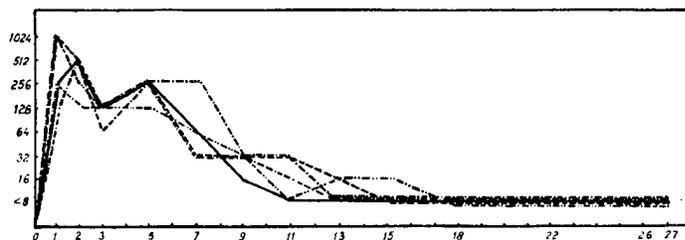
dělit na 2—4 uzle, které jsou za 10 dní jasně ohraničeny, 0,5 až 3 cm dlouhé, vejčité, někdy jantarově žluté a tvrdé. Po měsíci, a stejně po třech až šestnácti měsících, je mazlavá centrální hmota uzavřena v tuhém vazivovém pouzdru s vyhlazenou vnitřní stěnou. Jindy dochází k plošné organizaci adjuvans a v podkoží se tvoří rozsáhlý plášť granulační, později fibrosní tkáně. U stejnostranných axilárních lymfatických uzlin je patrné až dvojnásobné zvětšení proti uzlinám druhé strany,



Obr. 4. Hladina protilátek u pěti králíků, kterým bylo vstříknuto samotné lipidní adjuvans a na opačnou stranu těla čtrnáct dílčích dávek antigenu jako u obr. 3.



Obr. 5. Hladina protilátek u pěti králíků, kterým bylo vstříknuto samotné lipidní adjuvans a po něm do téhož místa 1 ml suspence *S. paratyphi B*.

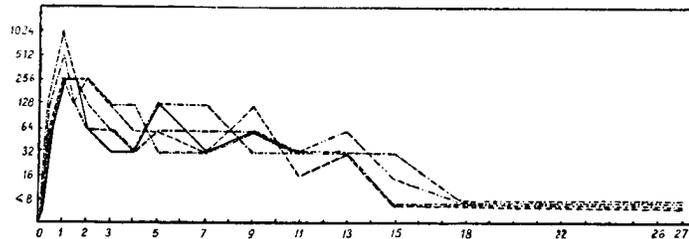


Obr. 6. Hladina protilátek u pěti králíků, kterým bylo vstříknuto samotné lipidní adjuvans a na opačnou stranu těla antigen jako u obr. 5.

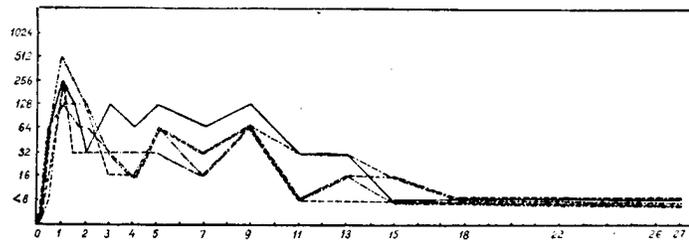
a to od prvního dne až po 4 měsíce. Slezina se u většiny zvířat mírně zvětšuje, má zaoblené okraje a v prvních týdnech mírně setřelou kresbu malpighických tělísek. V plicích jsou po 48 hod. patrná šedožlutá ložiska, mírně se vyklenující pod pleurou na basích plicích.

Relativní váha sleziny se pohybuje nad normálními hodnotami (0,4 až 0,6 ‰ u našich králíků této rasy) od pátého dne po imunisaci, dosahuje až 2,05 ‰

osmého dne a 1,468 ‰ za čtyři měsíce. Později klesá na normální hodnoty, ačkoli slezina je makroskopicky i mikroskopicky dosud hyperplastická: zvířata po tak dlouhé době zvyšují svou váhu na 4.500 g, mají mohutné tukové polštáře a relativní váha orgánů již není souměřitelná s poměry u mladých a pohyblivých zvířat. Absolutní váha sleziny je v této době vysoká (přes 2 g). Nadledvinky se udržují svou relativní vahou nad průměrem, zjištěným u těchto králíků (0,1 až 0,2 ‰ od osmého



Obr. 7. Hladina protilátek u pěti králíků, kterým byl vstříknut podkožně jen parafinový olej s lanolinem (2 ml celkem) a za 6 dní do téhož místa 1 ml suspence *S. paratyphi B*. Vpich antigenu je v bodu 0.



Obr. 8. Hladina protilátek u pěti králíků normálně podkožně imunizovaných 1 ml suspence *S. paratyphi B*.

dne až do ukončení pokusu (relativní váhy 0,204 až 0,340 ‰). Uvážíme-li normální snížování váhy nadledvinek u králíků starších patnácti měsíců, je zvýšení váhy nadledvinek u pokusných zvířat ještě význačnější. U ostatních pokusných skupin je tendence k zvýšení relativní váhy nadledvinky u zvířat s lipidním adjuvans a antigenem vstříknutým s. c. ve čtrnácti dávkách (0,221 až 0,301 ‰).

Histologický obraz jednotlivých oblastí a orgánů:

Ložisko lipidního adjuvans. Kromě edému, překrvení a fragmentace tkáně je kolem tukových hmot patrná za 4 hod. aktivace makrofágů. Za 12 hod. tvoří tuk velká oka ve vyroněném fibrinu, v němž jsou mocné shluky polymorfonukleárních leukocytů, zčásti již odumírajících, a jaderných fragmentů. Z periferie přibývá makrofágů a lymfocytů. Za 2 dny je destrukce polymorfonukleárů všeobecná; z periferie tukových ložisek a kolem tukových ok počíná proliferace fibroblastů a tvorba granulační tkáně. Prozatímni opouzdření tukových ok je dokončeno za 7 dní. Oka jsou lemována tenkými vrstvami epitheloidních buněk, oddělena mocnými snopci granulační tkáně. V okolí ok jsou četné lipofágy, kolem cév shluky lymfocytů, ojedinělé plasmatické buňky, eosinofily a žírné buňky. Makrofágy nabývají nejpeštrejších tvarů, a někdy dochází k tvorbě mnohojaderných buněk. V některých případech jsou tyto buňky zcela výjimečné. Zvyšuje se pyroninofilie plasmy fibroblastů, nefagocytujících makrofágů a obrovských buněk. Mezibuněčné hmoty s výjimkou ostrůvků kolem lymfocytárních shluků a kolem makrofágů zvyšují svou metachromasi a pozitivitu v barvení PAS. Za 9 dní je naznačeno kolagenními vlákny opouzdření jednotlivých ok i celých ložisek, která mají někdy charakter abscesů s centrálním nahromaděním detritu. Typičtější je však systém tenkostěnných dutin o průměru 300–400 μ , které se novými a novými nárazy proliferace fibroblastů z periferie zvolna překrývají fibrilárními sítěmi a infiltrací makrofágů a lymfocytů, v prvním měsíci i polymorfonukleárů, u nichž je

patrna nová větší invase mezi desátým a čtrnáctým dnem. Popsané systémy dutin nacházíme i po sedmi, devíti a šestnácti měsících, kdy také dosud trvá zřejmé úsilí nových a nových zon granulační tkáně a nových generací makrofágů (mezi nimiž ubývá obrovských a epitheloidních buněk) o překrytí a pohlčení tuku, který je dosud bezpečně prokazatelný. Ve stěnách těchto dutin, ve stěnách cév a ve vnitřních vrstvách stěny abscesů tvořených málo buněčným vazivem, ale mimo nové zony granulační tkáně, je vysoká gama metachromasie a vysoká barvitelnost PAS. Při vazivové přeměně granulační tkáně se vytvářejí četné rozsáhlé krevní prostory, které přetrvávají i v některých partiích vaziva a dodávají tkáni až vzhledu hemangiomu. Kolem cév jsou od sedmého dne až do konce pokusu stále ostrůvky lymfocytů, mezi nimiž jsou trvale ojedinělé buňky plasmatické. Pyroninofilie ostatních buněk se po sedmi měsících zvolna snižuje. (V podstatě stejný obraz časné reakce na lip. adjuvans s bruceleovým antigenem popsali u nás Vaněček a spol. 1954.)

Lymfatické uzliny. Ve spádových axilárních uzlinách, jejichž okolí je záhy infiltrováno lymfocyty, makrofágy a polymorfonukleáry, je za čtyři hodiny značná dilatace splavů. Ve splavech korových i dřevných jsou kapky tuku, které ve dřeni tvoří až systém tukových ok, kolem něhož pak počíná stejný proces lipofagie a granulačního a kolagenního opouzďení jako v místě vpichu adjuvans. Zejména ve dřeni je v prvých dnech patrný edém, infiltrace polymorfonukleárů, které jsou rychle fagocytovány značně zmnoženými makrofágy. Obrovské buňky jsou ojedinělé a jen u některých králíků. Je snížen obsah lymfocytů v dřeni i koře uzlin, za 5 dní však proliferace primitivních retikulárních buněk a polymorfonukleárů (ve větších uzlinách v rostoucích folikulech) ztráty nahrazuje. Ve dřeni se objevují četné buňky s pyroninofilní plasmou a velkými jádry o jemné chromatinové struktuře, z nichž většina se dá identifikovat jako lymfoblasty a plasmablasty, a od sedmého dne až do šestnáctého měsíce je zde málo kolísající podíl plasmatických buněk (ve dřeni perivaskulárně a na okrajích dřevných provazců asi 10 %). Pouzdro uzliny se vazivově zesiluje a stoupá jeho metachromasie (positivita PAS). V tukové tkáni v okolí uzlin je za 4–14 dní po vstřiku lipidního adjuvans patrna novotvorba lymfatických uzlíků, perivaskulárně i tvorba drobných granulomů a aktivace makrofágů.

V uzlinách axilárních druhé strany, jakož i v uzlinách paraaortických břišních a popliteálních dochází k analogické reakci plasmatických buněk a k mírnému zmnožení husté lymfatické tkáně.

Slezina. Tuk je prokazatelný kolem splavů, především subkapsulárně, kapénky jsou uloženy většinou intracelulárně v makrofázích, ojediněle, u některých pokusných zvířat, dochází k tvorbě větších mimo-buněčných kapének a tvorbě drobných granulomů kolem nich. Tukové kapénky v makrofázích jsou prokazatelné ještě za 16 měsíců. V prvých dnech dochází difusně v červené pulpě k aktivaci endothelií a zmnožení makrofágů. V subkapsulárních splavech je polymorfonukleární infiltrace. Lymfatické folikuly se zmenšují a zvyšuje se podíl červené pulpy. Počínají se tvořit marginální zony z primitivních retikulárních buněk s pyroninofilním plasmatem, které nabývají po týdnu značné šíře. Po čtyřech dnech se objevují v červené pulpě u některých králíků četné obrovské buňky, roste podíl sekundárních folikulů, tvoří se nové folikuly. Bílá pulpa však až po šesti měsících vyrovnává zvýšený podíl pulpy červené, v níž perivaskulárně a v rozsáhlých lemech primárních retikulárních buněk kolem folikulů je za tři týdny 10 %, za 3 až 7 měsíců 10–22 % a za šestnáct měsíců 4 % proplasmatických a plasmatických buněk, zpravidla ve shlucích. Mezi polymorfonukleární pulpy jsou konstantně četné přechody k plasmatickým buňkám.

Kostní dřeň (z levého femuru). Od druhého dne je krvetvorná dřeň hyperplastická, s převahou bílé řady a s metamyelocytovým charakterem. Hyperplasie odeznívá za dva měsíce.

Ileum. Změny v lymfatickém aparátu jsme nepozorovali.

Plic. Tukové kapénky nalézáme od prvých dnů v lymfatických cestách. Subpleurálně, méně pak peribronchiálně se tvoří drobná ložiska tukových hmot, kolem nich se vytváří granulační tkáň s četnými syncytiálními útvary. Tyto granulomy se vyskytují i za 9 a 16 měsíců. Subpleurálně se tvoří nevzdušná ložiska s mohutným zmnožením septálních makrofágů, rozšiřují se difusně septa, v nichž v prvých dnech nacházíme nečetné polymorfonukleáry. Zvětšují se též peribronchiální uzlíky lymfocytů s vtroušenými plasmatickými buňkami. I tento stav trvá až do šestnáctého měsíce.

Játra. Ojediněle nacházíme po čtyřech dnech v portobiliárních prostorech drobné kapénky tuku, u všech pokusných zvířat jsou zde však lymfocytární shluky. Po týdnu dochází i k tvorbě drobných granulomů. Kupfferovy buňky jsou většinou aktivovány. Je zvýšený prostup lymfocytů do žlučovýchodů. U zvířat nejdéle chovaných v pokusu nalézáme také nespecifické ložiskové drobnokapénkové ztukování jaterních buněk.

Ledviny. Kromě proliferace endothelií glomerulárních v prvých dnech a mírné infiltrace glomerulů lymfocyty není příznačných změn. V tuku pánvičky ledvinné dochází mezi čtvrtým až desátým dnem k podstatnému zmnožení plasmatických buněk, které zastihujeme ještě po osmi měsících.

Nadledvinky. Po přechodném snížení obsahu tuku v zevních zónách kory následuje po měsíci pokračující rozšiřování glomerulosy i fasciculaty (někdy i subkapsulárního blastemu) s výsledným zvětšením orgánu. Od druhého dne do tří týdnů je patrna proliferace litorálních buněk sinusoidů.

Hypofýza. Bez příznačných změn.

U králíků, jimž bylo do ložiska lipidního adjuvans nebo kontralaterálně vpraveno čtrnáct dávek antigenu (skupina B 2), je opouzďení granulonu rychlejší a za sedm měsíců zbývá jen drobné ložisko tukových hmot v pevných kolagenních pouzdrech bez náznaku nových granulací. U nich i u skupiny

normálně podkožně imunisovaných (skupina B 3) se vyrovná podíl červené a bílé pulpy sleziny a ubývá plasmatických buněk sleziny (po maximu 8–12 % v červené pulpě a v lemech kolem folikulů) za tři týdny po ukončení imunisace. Stejně ubývá plasmatických buněk i v místních uzlinách, jejichž reakce na tukové hmoty (skupina B 2) je rovněž nižší. V plicích kromě polymorfonukleární infiltrace sept v prvním dnu a zmožení makrofágů není trvalejších změn. Hyperplasie a hypertrofie kory nadledvinek je naznačena u králíků skupiny B 2.

U králíků, jimž byl vstříknut jen parafinový olej s lanolinem (B 4), je za 6 dní rozvinut obvyklý proces opouzdřování granulačních tkání, avšak s menší tendencí k tvorbě epitheloidních lemů, bez obrovských buněk a s menší infiltrací lymfocytární. V uzlinách místních a ve slezině jsou zmoženy makrofágy, retikulární buňky a naznačeny granulace.

Diskuse

Z výsledků u jednotlivých pokusných skupin vyplývá, že účinek lipoidního adjuvans nelze napodobit izolovaným vpravěním lipoidní látky a antigenu, ani opakovanými injekcemi malých dávek antigenu po dobu, kdy asi trvá vstřebávání největšího množství antigenu z ložiska adjuvans (14 dní).

Kromě menší příkrostiti sestupného ramene křivky protilátek nebylo většího rozdílu ani mezi imunisací čtrnácti každodenními dávkami antigenu o obsahu $\frac{2}{14} \cdot 10^9$ mikrobů a mezi normální podkožní imunisací jedinou dávkou $2 \cdot 10^9$ mikrobů. Našel-li na př. Carlinfanti (1951) naopak značnější zvýšení titru protilátek dělením dávek antigenu (zvláště při vstříkávání do různých míst), je to vysvětlitelné tím, že u difterického toxoidu, s nímž pracoval, jsou podmínky antigenního působení, destrukce a eliminace antigenu jiné než u antigenu korpuskulárního.

Škola Zdrovského ukazuje u toxoidu i u korpuskulárních vakcín (Chaljapina 1954, Klimentova 1954, Vorobev 1955) zvýšení titru protilátek a podstatné zvýšení imunologické reaktivity při dlouhodobém (dvouměsíčním) vstříkávání poměrně velkých dávek antigenu v pětidenních intervalech. Uspořádání naší imunisace opakovanými dávkami je ovšem odchylné a nemůžeme proto oba způsoby porovnávat. Není však možno souhlasit se závěrem Chaljapiny a Zdrovského, že depotní imunisace je v podstatě pouze mnohonásobným drážděním dávkami antigenu. Vidíme zásadní rozdíl mezi všemi našimi skupinami s opakovaným vpravováním antigenu a mezi skupinou s lipoidním adjuvans. Bylo by snad nutno delší dobu vpravovat nepatrné dávky antigenu do nejrůznějších míst, kam lipoidní adjuvans antigen zavléká, aby se odpověď při imunisaci opakovanými dávkami poněkud přiblížila odpovědi při použití úplného lipoidního adjuvans a aby se více odlišila od prosté, jednorázové imunisace.

Chaljapina přitom přímo vylučuje účast zánětlivého dráždění. To je, myslím, nesprávné u většiny druhů depotní imunisace a u imunisace lipoidním adjuvans zvláště, neboť parafinový olej je klasickým zánětovorným činitelem. Citovaní již jiní autoři (Terentev a Stefanova 1954, Ramon 1955), a mnohé starší práce naopak zdůrazňují význam zánětu a dráždění ze zánětlivého ložiska, ať už nervovou či také jinou cestou. Je nutno uvažovat o zvýšené metabolické úrovni, navozené zánětem, o mobilisaci tkáňových systémů, na niž by navazoval specifický účinek antigenu. Wood (1953) našel korelaci mezi množstvím Cx reaktivní bílkoviny, vyvolané zánětem z lipoidního adjuvans, a produkcí precipitinů na slabý antigen vstříknutý do žíly.

Skutečně také králíci připraveni působením samotného oleje a lanolinu (skupina B 4) mají zvýšený počet retikulárních, fibroblastických a makrofágových elementů všude, kde působily lipoidní cizorodé látky a tvoří také rychleji protilátky po antigenním podnětu. Samotný zánět nadto může stimulovat nadřazené regulační soustavy organismu a vzbudit větší či menší celkovou reakci (s negativní a pozitivní fází), která zahrnuje i změny lymfatické tkáně, po př. i s vyžráváním plasmatických elementů, jak to našli po injekcích formolu Lundin, Schelin, Pellegrini a Mellgren (1954). V našem materiálu je kromě rychlejšího nástupu protilátek ve skupině 7. jen nevýznamné zvýšení titrů protilátek tam, kde spolupůsobil zánět z lipoidního adjuvans (skupiny 6, 7, 5).

Existuje tedy určitý podpůrný metabolický účinek samotného zánětu, který ovšem nemůže naprosto sám vysvětlit mohutný účinek vodní suspense antigenu v lipoidním adjuvans.

Ložisko proliferativního zánětu má však ještě další, mechanickou funkci: zadržování antigenu v místě vstříku, poněkud chráněném fibrinovými masami, zachycování cirkulujícího antigenu (pokud byl vpraven v době, kdy ložisko není dosud

zacloněno fibrilárním valem, jak je tomu ve skupině 7) a zachycování cirkulujících a difundujících protilátek, jež je právě jednou z podstatných imunologických funkcí zánětu (Menkin 1953). Touto funkcí zánětlivých ložisek si vysvětlují určité oblenění poklesu titru protilátek ve skupinách 5 a 6 a také ve skupině 3. Při detekci protilátek fluorescenční metodou (White, Coons a Connolly 1955) dávají tvořící se vláknité struktury význačně pozitivní reakci. Zachycování kolujícího antigenu má ovšem jen podmíněný podpůrný význam: vede ve zmnožených makrofázích také k rychlejší destrukci antigenu, jak to vidíme u naší skupiny 5. Při opětovaných vpiších antigenu (skupina 3 a 4) do granulomu se nezastihne asi vždy jeho centrum a kontakt antigenu s buněčnou reakcí není tak bezprostřední. K témuž závěru docházejí i White, Coons a Connolly (1955). Také Walsh a Smith (1951) našli po předchozím působení makrofágů a polymorfonukleárů na antigen (in vitro) sníženou jeho účinnost po vpravení do těla.

Existuje tedy i malý podpůrný účinek samotného zánětu v adsorpci protilátek a v zadržování antigenu.

Posléze chemicky vyvolaný zánět snižuje — aspoň dočasně — i proteolytické vlastnosti sera (Moll 1956). Ani to však nestojí v popředí při působení lipoidního adjuvans.

Injekce lipoidního adjuvans s emulgovaným antigenem vede — na rozdíl od izolovaného vpravení obou složek — k vytvoření granulomů, v nichž po dobu nejméně půl druhého roku (pro zde popsané složení adjuvans se *S. paratyphi B*) probíhá interakce mezi tkání a vpraveným minerálním olejem a jím chráněným antigenem. Stále a stále pronikající svazy buněk granulační tkáně a fagocytů uvolňují postupně částice antigenu a umožňují, ať už samy nebo prostřednictvím specializovaných buněk ve stimulovaných lymfoidních tkáních, dlouhodobou tvorbu protilátek. Při ní se tvoří v relativně vyšším množství protilátky inkompletní, jak naznačují i naše orientační zkoušky (zejména CCAT) a jak to předpokládají mnozí autoři (souborně Schmidt 1954). Inkompletní protilátky mohou pak být reakcí na komplexy vznikající vazbou antigenu s protilátkami dříve vytvořenými (Najjar a Fischer 1955). Vysokomolekulární komplexy vznikající při reakci antigenů s protilátkami mohou vyvolávat další proliferace granulační tkáně (Meier, Dessaulles a Schär 1955). Tak se snad vybavuje dlouho fungující reakční kruh, v němž je podstatným článkem ochrana antigenu těžko metabolizovatelnými lipoidními látkami a jenž je tlumen teprve vyčerpáním antigenu, po případě vznikem specializovaných buněčných forem, jako jsou makrofágy s novými lipolytickými enzymy (Vogel 1951), nebo obrovských buněk. V jejich pomalém vzniku vidí Gindin a Živ (1955) příčinu dlouhodobého působení antigenu při depotní imunisaci; podle našeho materiálu však jsou obrovské buňky jen dočasným zjevem při dění v granulomech.

Během tohoto procesu se pak uvádí do pohybu mnoho dalších činitelů místních i celkových, které jej dále ovlivňují a modifikují. Cyklické pochody depolymerisace a polymerisace mezibuněčných hmot (kyselých polysacharidů) postupují ruku v ruce se změnami buněčnými a látkovými (Cavallero 1953) a vedou k tvorbě účinných mechanických valů mezi granulačními ložisky a ostatní tkání, nebo při depolymerisaci a hydrolyse v reaktivovaných ložiscích k tvorbě látek (glukuronová kyselina), schopných interakce s cizorodými bílkovinami (Duran-Reynals a Mc Crea 1953). Polymerisace je po ročním trvání granulomu obzvláště vysoká. Vysoká vaskularisace ložisek zvyšuje na druhé straně možnost difuze protilátek a působků z jiných částí těla, působků, mezi nimiž při dlouhotrvajícím procesu (t. zv. adaptační fáze zánětu, Ehrlich 1953) přibývá nepochybně činitelů anabolisujících (STH), které zároveň podporují činnost buněk syntetisujících protilátky.

Dlouhodobé přetrvávání místního procesu (i metastatických ložisek) znamená nesrovnatelně větší celkovou, specifickou i nespecifickou stimulaci než samotný chemicky vyvolaný zánět. Nacházíme proto jak hyperplasii lymfatických orgánů (zejména sleziny a její červené pulpy), tak i hyperplasii nadledvinkové kory. Regu-

lace celého reakčního kruhu je nesporně těsně spjata s kortikoidy: předávkování některého z adaptačních hormonů vede k útlumu celého procesu (Fischel a spol. 1953, 1954).

Je však třeba uvažovat o zvláštní účinnosti různých mikrobiálních principů zavedených s lipoidním adjuvans. Jako mají podpůrný účinek frakce mykobakterií, tak i endotoxické složky gramnegativních bakterií či jejich lipopolysacharidové frakce samy zvyšují celkovou reaktivitu retikuloendotheliálního systému v orgánech (Biozzi, Benacerraf a Halpern 1955, Dubos a Schaedler 1956) a mají adjuvantní účinek, který se zde pravděpodobně sčítá s účinkem minerálního oleje.

Posléze, jak již naznačeno, přímý účinek lipoidního adjuvans se rozšiřuje z místa vpichu také zavlékáním kapek oleje s chráněným antigenem do orgánů. Vytěti místních ložisek v době, kdy již počal tento rozsev a celkové stimulační působení (to je již za půl hodiny po vpichu), nepotlačí tvorbu protilátek. Později, po 1—2 týdnech ji dokonce ani nesníží, jak ukázal sám Freund (1951) nebo Westwater (1940a, b). Ložisko vzniklé vstříkem adjuvans je ovšem hlavním skladištěm materiálu emulze intaktní či pozměněné činností buněk, sladištěm, které ve formě chronického abscesu může přetrvat velmi dlouhou dobu. Bakteriální antigen našli Halbert, Mudd a Smolens (1946, cit. White a sp.), ještě za 22 týdnů, bílkovinný antigen Talmage a Dixon (1953) po dvou týdnech; v chronickém abscesu je popsáno uchování na př. virulentní infekce po desítky let. Ale metastasování do plic, jater a zejména do lymfatických tkání přivádí zvolna uvolňovaný antigen do kontaktu s mnohem většími rezervami buněk, které dávají vznik plasmatickým prvkům, u nichž je produkce protilátek stále nejpravděpodobnější (White, Coons a Connolly 1955). Granulom sám — soudě podle obsahu plasmatických buněk — se na tvorbě protilátek významně neúčastní. U morčete a pro rozpustný antigen totéž dokázali Askonasová a White (1956).

Souhrn

Účinek lipoidního adjuvans s emulgovanou inaktivovanou vodní suspenzí *Salmonella paratyphi B* jsme sledovali u králíků serologicky a histologicky po osmnáct měsíců. Porovnávali jsme tento účinek s různě sestavenými injekcemi samotného lipoidního adjuvans a samotného antigenu. Ani v případě čtrnáct dní opakovaných injekcí antigenu do ložiska adjuvans pod kůži pokusného zvířete nebyl vyvolán obraz bližší adjuvantní imunisasi než normální podkožní imunisasi. Nalezli jsme jen malý podpůrný účinek zánětu ze samotného lipoidního adjuvans. Parafinom vyvolaný pouze olejem bez antigenu nevykazoval již po sedmi měsících granulární aktivity, zatím co emulze vodní suspense antigenu v oleji vyvolává tvorbu mocných kolagenických pouzder kolem ložisek adjuvans, v nichž velmi dlouho (16 měsíců) pronikají zony granulární tkáně a velmi pozvolně se odbourává chráněný antigen. Metastatická granulární ložiska ze zavlečeného adjuvans byla nalezena v místních uzlinách, slezině, plicích a játrech. Docházelo k dlouhodobé stimulaci a hyperplasii lymfatických tkání s relativně vysokým obsahem plasmatických buněk v červené pulpě sleziny a ve dřeni uzlin, menším v místních granulomech a s přechodným jich zmnožením v tuku sinu ledvin a k hyperplasii nadledvinek.

Titř aglutinačních protilátek byl až do osmnáctého měsíce vyšší než 1 : 8, titř inkompletních protilátek se relativně zvyšoval v pozdních stadiích působení adjuvantního procesu.

Adjuvantní proces proto vysvětlujeme především ochranou antigenu v místech deposice a vybavením dlouhodobého reakčního řetězce ze souhry místních a celkových činitelů, s možností stimulačního účinku komplexů vznikajících při reakci antigenu a protilátek na granulární schopnost tkání a s dlouhodobou stimulací lymfatických tkání a buněk produkujících protilátky. Je nutno počítat i s podpůrným účinkem endotoxinu salmonel.

Za technickou spolupráci děkuji Marcelle Koschové.

Literatura

- Askonas, B. A., White, R. G.: *Sites of antibody production in the guinea-pig. The relation between in vitro synthesis of anti-ovalbumin and γ -globulin and distribution of antibody containing plasma cells.* Brit. J. Exp. Path. 37 : 61, 1956.
- Biozzi, G., Benacerraf, B., Halpern, B. N.: *The effect of Salm. typhi and its endotoxin on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system in mice.* Brit. J. Exp. Pathol. 36 : 226, 1955.
- Bürki, F., Fey, H.: *Blockingtest und modifizierter Coombstest in der Serodiagnostik der menschlichen Brucellosen.* Schweiz. Zschr. Allg. Path. Bakt. 16 : 945, 1953.
- Cavallero, C.: *Études sur la régulation hormonale de l'inflammation.* Rev. Canad. Biol. 12 : 189, 1953.
- Carlinfanti, E.: *Antitoxin response to repeated (daily) doses of diphtheria toxoid.* J. Immunol. 66 : 311, 1951.
- Chaljapina, K. T.: *Immunogeničeskaja reaktivnost i jeje fiziologičeskije zakonomernosti.* Voprosy infekcionnoj patologii i immunologii, Moskva 1954.
- Dubos, R. J., Schaedler, R. W.: *Reversible changes in the susceptibility of mice to bacterial infections. I. Changes brought about by injections of pertussis vaccine or of bacterial endotoxins.* J. Exp. Med. 104 : 53, 1956.
- Duran-Reynals, F., Mc Crea, J. F.: *The ground substance of the mesenchyme in inflammation.* Rev. Canad. Biol. 12 : 262, 1953.
- Ehrlich, W. E.: *Adaptation phase in inflammation.* Rev. Canad. Biol. 12 : 127, 1953.
- Fischel, E. E., Kabat, E. A., Stoerk, H. C., Bezer, A. E.: *The role of tubercle bacilli in adjuvant emulsions in antibody production to egg albumin.* J. Immunol. 69 : 611, 1952.
- Fischel, E. E., Kabat, E. A., Stoerk, H. C., Skolnick, M., Bezer, A. E.: *Suppression by cortisone of granuloma formation and antibody in guinea pigs receiving egg albumin with Freund adjuvants.* Fed. Proceedings 12 : 442, 1953, J. Allergy 25 : 195, 1954.
- Freund, J.: *Some aspects of active immunisation.* Ann. Rev. Microbiol. 1 : 291, 1947.
- Freund, J.: *The effect of paraffin oil and tubercle bacilli on antibody formation and sensitization.* Amer. J. Clin. Path. 21 : 645, 1951.
- Freund, J., Casals-Ariet, J., Genghof, D. S.: *The synergistic effect of paraffin oil combined with heat killed tubercle bacilli.* J. Immunol. 38 : 67, 1940.
- Freund, J., Lipton, M. M., Pisani, T. M.: *Immune response to rabies vaccine in water-in-oil emulsion.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68 : 609, 1948.
- Freund, J., Schryver, E. M., Mc Guinness, M. B., Geitner, M. B.: *Diphtheric antitoxin formation in the horse at the site of toxoid and adjuvants.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81 : 657, 1952.
- Freund, J., Stern, E. R., Pisani, T. M.: *Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion.* J. Immunol. 57 : 179, 1947.
- Freund, J., Thomson, K. J., Sommer, H. E., Walter, A. W., Pisani, T. M.: *Antibody formation and sensitization with aid of adjuvants.* J. Immunol. 60 : 383, 1948.
- Gindin, A. P., Živ, B. V.: *Morfologičeskoje izučenje mestnoj reakcii na vvedenie kišečnych vakcin.* Voprosy aktivnoj imunizacii protiv kišečnych infekcii, Moskva 1955.
- Hole, N. H., Coombs, R. R. A.: *The conglutination phenomenon.* J. Hyg. 45 : 480, 490, 497, 1947.
- Hummel, K.: *Die inkompletten Antikörper in der Immunobiologie.* Stuttgart 1955.
- Janev, E.: *Sdělení na imunologické konferenci ČSAV, Liblice, 1954.*
- Klimentova, A. A.: *Summacija razdraženii pri imunizacii korpuskuljarnymi antigenami.* Voprosy infekcionnoj patologii i immunologii, Moskva 1954.
- Lundin, P. M., Schelin, U., Pellegrini, F., Mellgren, J.: *Plasma cell production in the adaptation syndrome.* Acta Path. Microbiol. Scand. 35 : 339, 1954.
- Meier, R., Desaulles, P., Schär, B.: *Über die Wirkung von Mischungen eines antigenhaltigen Plasmas mit einem antikörperhaltigen Serum auf die Entwicklung des Fremdkörpergranuloms.* Experientia 11 : 442, 1955.
- Menkin, V.: *Modern views of inflammation.* Int. Arch. Allergy 4 : 131, 1953.
- Moll, F. C.: *Studies on serum proteolytic enzyme inhibition. Effect of tissue destruction, cortison acetate, and splenectomy on the serum trypsin inhibitor.* J. Exp. Med. 103 : 363, 1956.
- Najjar, V. A., Fischer, J.: *The mechanism of antibody-antigen reaction.* Science 122 : 1272, 1955, Biochim., Biophys. Acta 20 : 158, 1956.
- Patočka, F., Slonim, D.: *Pokus o imunisaci proti chřipce za použití lipidních adjuvancií.* Čs. hyg. epid. mikrobiol. imunol. 3 : 121, 1954.
- Patočka, F. a kolektiv: *Naše dosavadní výsledky imunisace za pomoci lipidních adjuvancií.* Sdělení na imunologické konferenci ČSAV, Liblice, 1954.
- Ramon, G.: *Le principe des substances adjuvantes et stimulantes de l'immunité a été posé il y a trente ans. Ses bases. Ses applications.* Bull. Acad. Vét. Fr. 28 : 337, 1955.
- Salk, J. E., Laurent, A. M.: *The use of adjuvants in studies on influenza immunisation.* J. Exp. Med. 95 : 429, 1952.
- Schmidt, H.: *Natur und Verhalten von unvollständigen Antikörpern im Allgemeinen.* Schweiz. Zschr. Allg. Path. Bakt. 17 : 400, 1954.

- Šterzl, J.: *Dlouhodobá imunita I. Útlum tvorby protilátek při každodenní imunitě*. Čs. mikrobiol. 1 : 7, 1956.
- Talmage, D. W., Dixon, F. J.: *The influence of adjuvants on the elimination of soluble protein antigens and the associated antibody response*. J. Infect. Dis. 93 : 176, 1953.
- Terentev, F. A., Stefanova, E. P.: *K voprosu o roli nervnoj sistemy v immunogeneze pri vakcinacii ubitymi mikrobnymi kulturami*. ŽMEI (2) : 20, 1954.
- Vaněček, R., Schindler, J., John, C.: *Tkáňová reakce při imunitě lipidními adjuvanciemi*. Sdělení na imunologické konferenci ČSAV, Liblice, 1954.
- Vogel, F. S.: *A lipolytic enzyme in reactive histiocytes of guinea pigs with experimental encephalomyelitis*. J. Exp. Med. 93 : 305, 1951.
- Vorobev, L. A.: *Immunogennost deponirovanovo anatoxina v závislosti ot stepeni sorbcii antigena*. Bjul. Exper. Biol. Med. 39 : 71, 1955.
- Walsh, T. E., Smith, A. O.: *The influence of polymorphonuclear leucocytes and macrophages on antibody production*. J. Immunol. 66 : 303, 1951.
- Westwater, J. O.: *Antibody formation in a tuberculous lesion at the site of inoculation*. J. Exp. Med. 71 : 455, 1940a.
- Westwater, J. O.: *Antibody formation in a lesion produced by tuberculous bacilli suspended in paraffin oil: excision of the antigenic depot*. J. Immunol. 38 : 267, 1940b.
- White, R. G., Coons, A. H., Connolly, J. M.: *Studies on antibody production. IV. The role of a wax fraction of Mycobacterium tuberculosis in adjuvant emulsions in the production of antibody to egg albumin*. J. Exp. Med. 102 : 83, 1955.
- Wood, H. F.: *The relationship between the acute phase response and antibody production in the rabbit*. J. Exp. Med. 98 : 311, 321, 1953.

Иммунологические и гистологические изменения при иммунизации липоидным adjuvans

М. Голубь

Резюме

Действие липоидного adjuvans (парафиновое масло с ланолином) с эмульсифицированной инактивированной водной взвесью *Salmonella paratyphi B* исследовалось нами у кроликов серологически и гистологически в течение 18 месяцев. Производилось сравнение этого действия с уколами различного состава липоидного adjuvans и антигена. Даже при 2-недельных ежедневных уколах антигена в подкожный очаг adjuvans у подопытного животного не возникла картина, которая бы больше напоминала адьювантную иммунизацию, чем нормальную подкожную иммунизацию. Было отмечено только незначительное вспомогательное действие воспаления от самого липоидного adjuvans. Парафинома, вызываемая одним только маслом, без антигена, уже через 7 месяцев не проявляла грануляционной активности.

Эмульсия водной взвеси антигена в масле вызывает образование под кожей плотных коллагенных капсул вокруг очага adjuvans, в которые зоны грануляционной ткани проникают лишь очень медленно (16 месяцев) и в которых очень скоро разрушается хранящийся в них антиген. Вторичные метастатические грануляционные очаги adjuvans были найдены в лимфатических узлах, в селезенке, легких и печени. Наблюдалось длительное стимулирование и гиперплазия лимфатических тканей (с относительно высоким содержанием плазматических клеток в красной пульпе селезенки и в мозговом веществе лимфатических узлов, — но с меньшим их содержанием в местных грануломах, — и со временным размножением их в жировой ткани синуса почек), а также гипертрофия и гиперплазия надпочечников.

Титр агглютинирующих антител вплоть до 18-го месяца бывал выше, чем 1 : 8, титр неполных антител несколько повышался в поздних стадиях действия адьювантного процесса.

Поэтому мы объясняем адьювантный процесс прежде всего как защиту антигена в местах его отложения и как возникновение длинной цепи реакций взаимодействия местных и общих факторов, — при возможности стимулирования действия на грануляционную способность тканей тех комплексов, которые возникают при реакции антигена с антителом, — как и длительного специфического и неспецифического стимулирования деятельности лимфатических тканей и клеток, вырабатывающих антитела. Необходимо учитывать также адьювантное действие эндотоксина *Salmonella*.

Immunological and Histological Changes in Immunization with a Lipoid Adjuvant

M. Holub

S u m m a r y

A serological and histological study was made of the action of an adjuvant (paraffin oil and lanolin) in combination with an emulsified, inactivated water suspension of *Salmonella paratyphi B* on rabbits, over a period of 18 months. A comparison was made of this action with that of isolated injections of the lipoid and of the antigen, in varying combinations. Even after injecting the antigen for 14 days into a deposit of the oil under the skin of the experimental animal, only a slight adjuvant effect was obtained and there was not much difference in antibody formation from that in normal subcutaneous immunisation. The granuloma from the lipoid adjuvant itself was smaller than the granuloma induced by the water-in-oil emulsion of antigen and it displayed no granulation activity after seven months.

An emulsion of a water suspension of the antigen in oil induces the subcutaneous formation of large collagenic capsules round the deposits of the adjuvant, in which zones of granulation tissue penetrate for a very long time (16 months) and the protected antigen is broken down very gradually. Metastatic foci of granulation from the adjuvant were found in the local lymph nodes, spleen, lungs and liver. Prolonged stimulation and hyperplasia of the lymphatic tissues occurred (with a relatively high content of plasma cells in the red pulp of the spleen and in the medulla of the nodes, a small content of local granulomata and transitory proliferation of these in the fat of the renal sinus) together with hyperplasia of the suprarenals.

The titre of agglutinating antibodies up to the 18th month was higher than 1 : 8; the titre of incomplete antibodies showed a relative increase in the last stages of the action of the adjuvant process.

The adjuvant process is, therefore, explained primarily as a protection of the antigen at the sites of deposition and as the elicitation of a prolonged chain of reactions from the interplay of local and general factors, with the possibility of the stimulating effect of complexes developing during the reaction of the antigen and antibodies on the granulation capacity of the tissues, and with prolonged specific and nonspecific stimulation of the lymphatic tissues and cells producing the antibodies. The enhancing effect of endotoxic components of Salmonellas may be included.

Československá
M I K R O B I O L O G I E

ročník 2. (1957) — č. 2

Použití respirometrie v půdní mikrobiologii. I.

Metodika makrorespirometrie

JAROSLAV DROBNÍK

Oddělení půdní mikrobiologie, Biologická fakulta Karlovy university, Praha

Došlo 3. 7. 1956

Sledování výměny plynů je jednou z cest, jak studovat biologické pochody přímo ve vzorku půdy. Zatím co pro měření tvorby kysličníku uhličitého bylo vypracováno mnoho metodik, je stanovení spotřeby kyslíku opomíjeno, hlavně snad pro nesnadnější metodické zachycení. Při tom jsou údaje o spotřebě kyslíku spolehlivé ve všech druzích půd a informují nás bezprostředně o mineralisačních pochodech.

Mikrorespirometrů se používá v krátkodobých pokusech. Jde buď o Warburgův přístroj (Gamble, Mayhew a Chappel 1952, Chase 1953, Rovira 1953) nebo jeho modifikaci (Johnston 1953). Při dlouhodobých pokusech ve Warburgově respirometru dochází k metodickým potížím (Johnston 1953). Kromě toho dovoluje Warburgův přístroj používat pouze několika gramů vzorku, což nepředstavuje průměrný vzorek při studiu mineralisace přirozených a často značně heterogenních substrátů, jako jsou rostlinné zbytky, mrva a komposty.

Pro studium déle probíhajících pochodů se proto hodí lépe přístroje, dovolující pracovat s 50 až 200 i více gramy půdy a umožňující snadnou náhradu vydýchaného kyslíku. V této práci popisujeme makrorespirometr, který dovoluje pracovat se 100 g půdy a po prakticky neomezenou dobu.

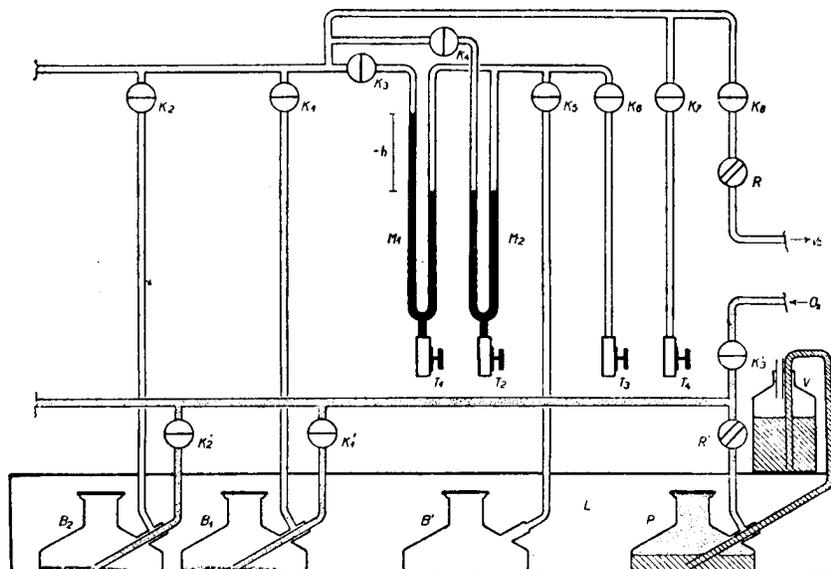
Popis přístroje

Jako pokusných nádob jsme nejdříve používali Fernbachových baněk s postranním tubusem (obr. 1) o obsahu 1500 až 1800 ml, s průměrem dna 210 mm. Jelikož tyto baňky nedovolují použít absorpčních kalíšků s dostatečně velkým povrchem, probíhalo pohlcování kysličníku uhličitého v louhu při vysokých respiračních rychlostech pomalu. Proto jsme zhotovili respirační komůrku, která tyto nedostatky nemá.

Je to podlouhlá plechová skříňka $200 \times 150 \times 50$ mm veliká, uzavřená na úzké straně kovovým víkem s gumovým těsněním a přitaženým šrouby. V zadní stěně má dvě trubky, z nichž horní pro přívod kyslíku ústí v polovině komůrky. Na postranních stěnách jsou dvě lišty k zasouvání skel se vzorky. Vzorek zeminy je rozprostřen na skleněné desce rozměrů 146×160 mm na ploše asi 120×130 mm. Takové desky mohou být do komůrky zasunuty dvě, čímž lze zvětšit užitečnou plochu a tak i citlivost přístroje. Jako absorpční nádoby používáme víka Petriho misky o průměru 120 mm, do níž dáváme 20 ml 5–10% KOH a filtrační papír nebo hrudky pemzy pro zvětšení povrchu. Poměr užitečné plochy k objemu komůrky je asi $312 \text{ cm}^2 : 1500 \text{ ml}$ (u Fernbachovy baňky asi $345 \text{ cm}^2 : 1800 \text{ ml}$). Pro respirační rychlosti pod 2 ml za hodinu není rozdíl mezi pokusem v baňce či komůrce. V této oblasti můžeme použít obou typů.

Skleněné baňky *B1*, *B2* nebo smaltované plechové komůrky (dále již jen „baňky“) jsou ponořeny v termostatické lázni *L* temperované s přesností desetiny stupně. První z trubiček je napojena přes kohouty *K'1*, *K'2* . . . na doplňovací kyslíkový (na obr. 1 tečkován) obvod a prochází tubusem na druhý konec baňky (do poloviny komůrky). Kyslík přechováváme v nádobě *P*, která je též ponořena v lázni. Odtud je vytlačován vodou z nádoby *V*. Za nádobou *P* je zařazen reduktor tlaku *R'*. Nádobu *P* plníme

kyslíkem přes kohout $K'3$. Druhá trubička vychází přímo z tubusu baňky a je spojena přes kohouty $K1$, $K2$. . . s měrnými rameny manometrů $M1$ a $M2$. Kontrolní rameno manometrů je zapojeno na prázdnou nádobu B' . Jako manometrické kapaliny používáme v manometru $M1$ obarveného alkoholu a v manometru $M2$ rtuti (pro větší rozdíly tlaků). Manometry lze odpojit uzavřením kohoutů $K3$ a $K4$. K vyrovnání tlaku v měřicím (kontrolním) obvodě slouží tlačka $T4$ ($T3$). Tlačky $T1$ a $T2$ regulují hladiny mano-



Obr. 1. Schema respirometru. Jsou zakresleny pouze dvě měřicí baňky $B1$ a $B2$ a jedna kontrolní B' . Používaný prototyp měl 20 měřicích a 4 kontrolní baňky. $K1$, $K2$ – kohouty měřicích, $K'1$ a $K'2$ kyslíkového obvodu; $K3$, $K4$ – kohouty manometrů; $K5$ – kohout kontrolního obvodu; $K6$ a $K7$ – kohouty tlaček; $K8$ – kohout evakuační a $K'3$ – hlavní kohout kyslíkového obvodu. $M1$ alkoholový, $M2$ rtuťový manometr. $T1$ a $T2$ tlačky vyrovnávající hladiny manometrů. $T3$ a $T4$ tlačky regulující tlak plynu v měřicím a kontrolním obvodě. R – reduktor vakua a R' – reduktor tlaku kyslíku. P – reservoár kyslíku.

metrické kapaliny. Tlak odečítáme na měrném (t. j. levém) rameni manometru. Abychom v kontrolním obvodě zachovali stále stejný tlak, stavíme meniskus v kontrolním rameni na nulu. Tímto zapojením se sice komplikuje rovnice přístroje, ale údaje pak nemusíme korigovat na změnu barometrického tlaku. Baňky evakuujeme přes reduktor vakua R a kohout $K8$. Spotřebu kyslíku a produkci kysličníku uhličitého počítáme jako u nepřímé Warburgovy metody.

Teorie přístroje

Přístroj je tedy založen na obdobném principu jako Barcroftův respirometr s tím rozdílem, že kompenzační rameno upravujeme vždy na nulu a kontrolní baňka představuje proto prostor s konstantním tlakem. Objem měrné baňky není ovšem konstantní. Je-li původní množství plynu (symboly viz Kleinzeller, Málek a Vrba 1954):

$$V'_0 = \left[V_p \frac{273}{T} (P - p) + V_k \alpha \cdot (P - p) \right] P_0^{-1} \quad (1)$$

pak je konečné množství:

$$V'_i = V'_0 + \Delta V = \left[(V_p + hA) \frac{273}{T} (P - p + h) + V_k \alpha \cdot (P - p + h) \right] P_0^{-1} \quad (2)$$

změna množství plynu je tedy:

$$\Delta V = h \cdot \left[V_p \frac{273}{T} + V_k \alpha + A \frac{273}{T} (P - p + h) \right] \cdot P_0^{-1} \quad (3)$$

U našeho přístroje, který má poměrně složitý rozvod, lze těžko stanovit přesný objem. Proto jsme konstantu stanovili výpočtem pouze přibližně a přesnou hodnotu jsme získali metodou Münzer-Neumannovou. Získané hodnoty se dobře shodovaly a pohybovaly se od 0,112 do 0,120 ml · mm⁻¹. Rozdíly hodnot pro různé výšky h byly sestaveny do grafu korekce.

V aerobních pokusech je třeba zajistit dostatečnou koncentraci kyslíku v plynné fázi. Pro své pokusy jsme jako přípustný výkyv určili kolísání koncentrace kyslíku maximálně $\pm 10\%$ původního množství. Při spotřebách 10–20 ml kyslíku na 100 g vzorku za hodinu, která se v některých pokusech vyskytla, a při celkovém objemu plynné fáze okolo 1400 ml to znamená, že kyslík musí být doplňován při této rychlosti respirace nejdéle za 90–270 minut. Plyn použitý k doplňování musí být upraven na teplotu lázně a musí být při této teplotě nasycen vodními parami. Původní koncentrace kyslíku v baňce je dána jeho parciálním tlakem P_{O_2} :

$$c_{O_2} = \frac{P_{O_2}}{P}$$

Po vydýchání — ΔV_{O_2} ml kyslíku je nutno obnovit jeho počáteční koncentraci; použijeme k tomu plynu, v němž je koncentrace kyslíku:

$$c'_{O_2} > c_{O_2}$$

K tomu, abychom obnovili výchozí stav, je nutno přidat Vx ml tohoto plynu. Výsledný tlak však musí být stejný, t. j. konečný objem veškerého plynu musí být opět V_0 . Proto je třeba předem z baňky odebrat Vy ml plynu. Pro baňky s louhem v absorpčním kalíšku, kde pokles tlaku přímo ukazuje spotřebu kyslíku, platí tedy:

$$Vx = -\Delta V_{O_2} - Vy \quad (4)$$

a pro baňku bez louhu v kalíšku:

$$Vx = -\Delta V_{O_2} - \Delta V_{CO_2} - Vy \quad (4a)$$

Jelikož součet změn množství kyslíku a kysličníku uhlíkatého se v této baňce projevují jako celková změna objemu plynné fáze ΔV , můžeme rovnici (4a) psát:

$$Vx = -\Delta V - Vy \quad (4b)$$

Vyjádríme-li podmínku, že dodané množství plynu (nasycené vodními parami o tensi p) má obnovit původní koncentraci c_{O_2} pak získáme pro Vx :

$$Vx = \frac{P}{P-p} c_{O_2}^{-1} \cdot \left[-\Delta V_{O_2} - Vy \left(c_{O_2} + \frac{\Delta V_{O_2}}{V_p} \right) \right] \quad (5)$$

Výraz $P \cdot (P-p)^{-1} \cdot c_{O_2}^{-1}$ je pro daný plyn a danou teplotu konstantní a označíme jej f . Pro baňku s louhem platí, dosadíme-li z (4):

$$-\Delta V_{O_2} - Vy = f \cdot \left[-\Delta V_{O_2} - Vy \left(c_{O_2} + \frac{\Delta V_{O_2}}{V_p} \right) \right] \quad (6)$$

z toho pak

$$Vy = \Delta V_{O_2} \cdot (1-f) \cdot \left[f \cdot \left(c_{O_2} + \frac{\Delta V_{O_2}}{V_p} \right) - 1 \right]^{-1} \quad (6a)$$

a obdobně pro baňku bez louhu

$$Vy = \Delta V - f \cdot \Delta V_{O_2} \cdot \left[f \cdot \left(c_{O_2} + \frac{\Delta V_{O_2}}{V_p} \right) - 1 \right]^{-1}$$

Dali jsme si podmínku, že koncentrace kyslíku v plynné fázi nesmí kolísat o více než 10% původní hodnoty. Vycházíme-li z počáteční koncentrace $c_{O_2} = 0,2$, je při splnění výše uvedené podmínky výraz $\Delta V_{O_2} \cdot V_p^{-1}$ menší než 0,02 a můžeme jej proto zanedbat. Výraz pro Vy se tím značně zjednoduší, zavedeme-li nové konstanty:

$$f' = \frac{1-f}{f c_{O_2} - 1}$$

$$f'' = \frac{1}{f c_{O_2} - 1}$$

získáme pro ně tvary

$$Vy = f' \cdot \Delta V_{O_2} \quad (7)$$

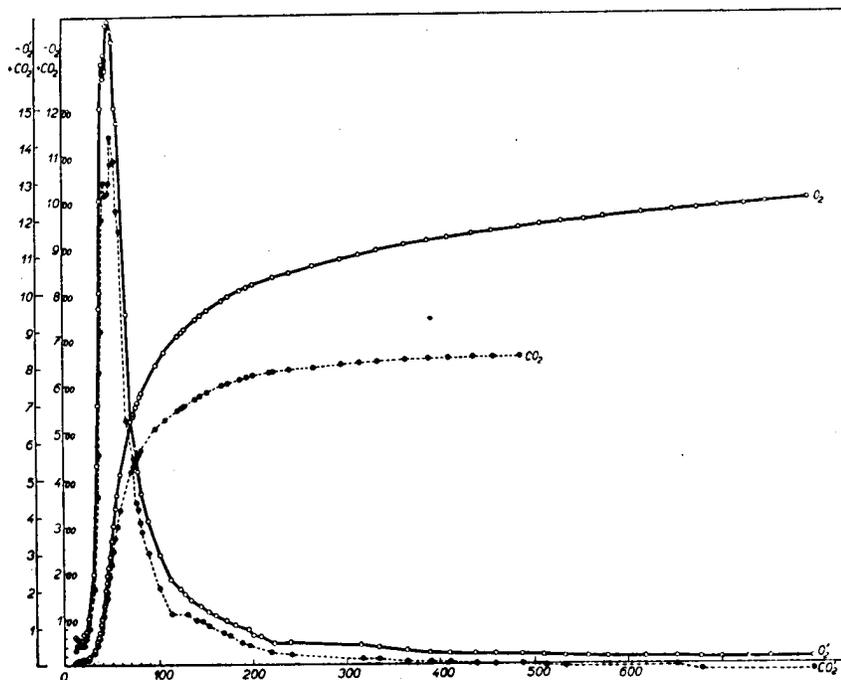
nebo

$$Vy = f'' \cdot (\Delta V - f \cdot \Delta V_{O_2}) \quad (7a)$$

které lze jednoduše vyjádřit graficky, nejlépe přímo pomocí měřených hodnot h . Doplnění kyslíku tedy nijak nezdržuje měření. Po určité době pokusu propláchneme nádoby vzduchem. Tím také zabráníme hromadění nepřesností při doplňování kyslíku, které se v kratší době nemohou projevit, ale v dlouhodobém pokusu by se mohly sečítat, a současně v baňce bez louhu vyměníme hromadící se kysličník uhlíkatý za dusík.

Výsledky měření

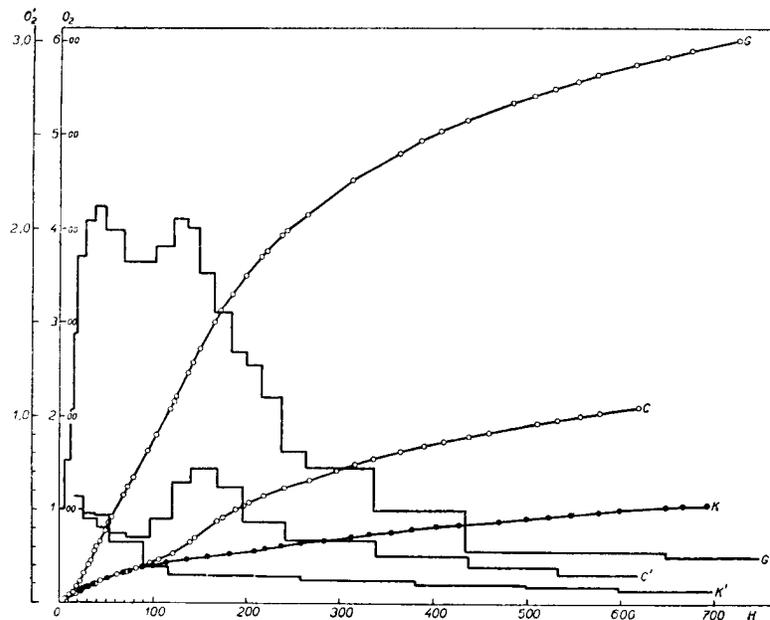
Pro výpočet produkce kyslíčnicku uhličitého je velmi významná každá odchylka v průběhu pochodů ve dvou paralelních baňkách. V tab. 1 proto uvádíme pro srovnání výsledky měření u dvou souběžných opakování téhož pokusu. Při posuzování výsledků v tabulce je třeba mít na zřeteli mez citlivosti přístroje (při dvouhodinových intervalech odečítání je asi $0,03 \text{ ml} \cdot \text{hod.}^{-1}$). Přesto však je zřejmé, že procesy v druhém opakování jsou poněkud zpožděny (asi o 2 hodiny), což se ve vzestupné části křivky projevuje stálým záporným, po zlomu křivky pak kladným rozdílem. Dále je z tabulky patrné, že hodnoty pro kyslíčnicku uhličitý jsou zatíženy většími chybami než pro kyslík.



Obr. 2. Spotřeba kyslíku a produkce kyslíčnicku uhličitého půdou, inkubovanou s 1 % kaseinu. Osa x : změna objemu plynu. Křivka O_2 — spotřeba kyslíku; O_2' — hodinová rychlost spotřeby kyslíku v ml. hod.^{-1} ; CO_2 — produkce kyslíčnicku uhličitého. CO_2' — hodinová rychlost produkce.

Jako příklad stanovení uvedeme spotřebu kyslíku luční půdou, inkubovanou bez substrátu a s glukosou, kaseinem a celulosou. Do baňky jsme navázili 100 g na vzduchu vyschlé půdy a rozdělili ji tak, aby pokrývala plochu asi 250 cm^2 . Vrstva byla 1–3 mm vysoká. Organické látky jsme přidávali v množství 1 %, a to kasein práškový přímo do půdy za sucha, práškovou celulosu (pro sloupcovou chromatografii) tímž způsobem a glukosu ve formě roztoku. Paralelně byly nasazeny vždy dvě baňky, z nichž jedna obsahovala absorpční nádobku s louhem. Půda byla ovlhčena na 60 % maximální vodní kapacity. Teplota lázně 20°C . Obsah uhlíku na začátku a na konci pokusu je v tabulce 2. Dusičnany nebyly zjištěny ani na počátku ani na konci pokusu.

Průběh respirace je uveden na obr. 2 a 3. Na obr. 2 je zachycena respirace půdy po přidání 1 % kaseinu. Je to příklad takřka horní hranice rozsahu přístroje. Respirační rychlosti nad 15 ml v hodině způsobují, jak vidíme, nepřesnosti v měření. Dále obr. 2 ukazuje, jak nespolehlivé jsou v tomto případě hodnoty pro kyslíčnick uhlíčitý. Klesají na nulu (500 hodin) i poněkud pod ní; po přidání plynného CO₂ (15 ml do baňky po 650. hodině) jsou záporné hodnoty již zcela zřetelné. Je to způsobeno tím, že pH stouplo během inkubace z původní hodnoty 6,04 na 8,50. Obr. 2 je



Obr. 3. Spotřeba kyslíku při inkubaci půdy: *K* — bez substrátu, *G* — s 1 % glukosy, *C* s 1 % práškové celulosy. Osa *x*: hodiny, osa *y*: změna objemu plynu. Křivky *K*, *G*, *C* — celková spotřeba v ml, *K'*, *G'*, *C'* — rychlost spotřeba v ml . hod.⁻¹.

sestrojen tak, že pro každé měření je vypočítána rychlost produkce. Pro menší rychlosti respirace je opět výhodnější druhý způsob, kdy rychlost produkce je propočítána vždy pro určitý větší úsek. Tímto způsobem je zakreslen obr. 3, který ukazuje tři další typy křivek: dvouvrcholovou křivku při respiraci s glukosou, nízké a zpožděné maximum při respiraci s celulosou a konečně křivku respirace pouze ovlhčené půdy.

Diskuse

Úkolem práce bylo sestavit přístroj k měření respirace půdy, který by vyhovoval těmto podmínkám: byl dostatečně citlivý a přesný, aby bylo možno podrobně a kvantitativně sledovat biochemické přeměny látek v půdě; dovozoval časté odečítání, abychom mohli v případě potřeby sestavit prakticky kontinuální křivku respirace; zaručoval, že během libovolně dlouhého pokusu se nezmění vlhkost vzorku a obsah kyslíku v plynné fázi neklesne pod stanovenou hranici; umožňoval bez zvláštních nároků na obsluhu současné sledování asi 10 dvojic baněk.

Z několika typů již navržených respirometrů jsme nemohli použít ani jednoho. Typ respirometru podle Swabyho a Passeye (1953) je sice vtipně řešen, nedovoluje však průběžné a spolehlivé stanovení produkce kysličníku uhličitého. Volumetrické přístroje (Lees 1949 a 1950), které aby byly dostatečně přesné, by vyžadovaly zdlouhavé manipulace. Rychlé odečítání dovoluje jedině manometrický princip. Po mnoha předběžných zkouškách jsme dospěli k popsanému řešení.

Tab. 1. Průběh spotřeby kyslíku a produkce kysličníku uhličitého ve dvou paralelních pokusech. Luční půda 100 g, glukosa 1 g, NaNO₃ 0,243 g, voda 18,5 ml, teplota 20 °C.

Doba pokusu hod.	Rychlost spotřeby kyslíku ml/hod.		Rozdíl	Rychlost produkce kysličníku uhličitého ml/hod.		
	I.	II.		I.	II.	
18,05	1,41	1,38	0,03	1,37	1,30	- 0,07
21,05	1,37	1,37	0,—	1,55	1,49	- 0,06
23,10	1,53	1,49	- 0,04	1,83	1,74	- 0,09
25,57	1,61	1,57	- 0,04	2,14	2,08	- 0,06
27,63	1,80	1,75	- 0,05	2,26	2,19	- 0,07
29,55	1,95	1,85	- 0,10	2,50	2,44	- 0,06
31,53	2,12	2,08	- 0,04	2,62	2,59	- 0,03
33,53	2,33	2,26	- 0,07	2,90	2,70	- 0,20
36,63	2,45	2,42	- 0,03	2,97	2,90	- 0,07
40,55	2,84	2,77	- 0,07	3,48	3,18	- 0,30
44,48	3,15	3,04	- 0,11	3,53	3,42	- 0,11
46,67	3,48	3,32	- 0,16	3,71	3,64	- 0,07
48,52	3,62	3,42	- 0,20	3,76	3,58	- 0,18
50,50	3,78	3,61	- 0,17	3,85	3,61	- 0,24
52,52	3,88	3,69	- 0,14	3,89	3,82	- 0,07
54,52	3,96	3,81	- 0,15	3,96	3,75	- 0,21
56,52	4,03	3,86	- 0,17	4,19	3,91	- 0,38
59,08	4,09	3,86	- 0,23	3,18	3,92	- 0,26
71,62	4,55	4,31	- 0,24	4,67	4,50	- 0,17
73,57	4,40	4,23	- 0,17	4,66	4,42	- 0,24
75,57	4,43	4,28	- 0,15	4,62	4,51	- 0,11
77,57	4,55	4,42	- 0,13	4,85	4,75	- 0,10
79,57	3,93	4,18	+ 0,21	4,20	4,40	+ 0,20
81,01	3,89	4,12	+ 0,23	4,25	4,45	+ 0,20
93,60	3,80	3,84	+ 0,04	4,48	4,50	+ 0,02

Citlivost přístroje je dána jeho konstantou. Jak jsme již uvedli, pohybují se konstanty baněk mezi 0,110 až 0,120 ml . mm⁻¹, t. j. odečítáme-li údaje na manometru s přesností 0,5 mm, zachytíme změny asi 0,06 ml.

Přesnost přístroje závisí na přesnosti, s jakou vypočítáme konstantu; v našich pokusech měly konstanty, vypočítané z jednotlivých měření (nejméně čtyř) maximální odchylku $\pm 0,001$ ml . mm⁻¹, t. j. 1 %. Dále závisí na přesnosti vytemperování lázně; maximálně pozorovaná odchylka tlaku ve dvou prázdných nádobách, umístěných v různé části lázně, byla $\pm 1,5$ mm, což představuje asi $\pm 0,18$ ml.

Přesnost stanovení závisí nejen na přesnosti přístroje, ale také na vzorcích. Vliv vzorku jsme ukázali v pokusu, jehož výsledky jsou v tabulce 1.

Odečítáním na přístroji získáme vždy spotřebu kyslíku a produkci kysličníku uhličitého v intervalu mezi dvěma měřeními (neboť kyslík doplňujeme vždy po každém měření). Sečítáme-li tyto hodnoty, dostaneme celkové množství plynů produkto-

vaných případně spotřebovaných od začátku pokusu a vynášíme je do grafu. Kromě toho z každého měření, nebo vždy za určitý interval vypočítáme rychlost změny objemu plynu a respirační kvocient (RQ). Hodnoty produkce kysličníku uhličitého jsou však věrohodné pouze u půd s pH nižším než 6,0. U neutrálních neb karbonátových půd je lze hodnotit jen přibližně. Vůbec se nelze na tyto údaje spolehnout v pokusech, kde vzniká amoniak, kyseliny, nebo se jinak mění pH.

Tab. 2. Obsah uhlíku na začátku a na konci pokusu v mg na 100 g půdy

Pokus	Substrát	Obsah uhlíku ve 100 g půdy	
		počáteční	konečný
1	0	1070	1030
2	glukosa	1470	1120
3	celulosa	1530	1370
4	kasein	1570	1120

Přidáme-li do půdy látku známého složení, můžeme vypočítat stupeň její oxydace jako poměr veškerého dosud spotřebovaného kyslíku ve variantě s přidanou látkou, zmenšeného o kyslík spotřebovaný v kontrole, k množství kyslíku, potřebnému k úplné oxydaci přidané látky. Platí jen tehdy, neovlivňuje-li substrát endogenní respiraci. U látek neznámého složení je nutno stanovit obsah uhlíku. V pokusech, kde přichází v úvahu nitrifikace, je třeba stanovit na počátku i na konci pokusu veškerý a nitrátový, případně i nitritový dusík.

Tím, že nahrazujeme vydýchaný kyslík podle popsaných pravidel, podařilo se nám udržet žádaný parciální tlak kyslíku v nádobách. Nelze ovšem přehlížet okolnost, že v baňce bez louhu je vzdušný dusík zvolna nahrazován kysličníkem uhličitým. Do jisté míry to lze zanedbat, neboť je známo, že půdní vzduch v přirozených podmínkách obsahuje značně zvýšené procento kysličníku uhličitého. Kdyby však koncentrace tohoto plynu stoupla nad hodnotu obvyklou v půdním vzduchu, mohl by se jeho vliv již projevit, zejména na paralelité průběhu pochodu v baňce s louhem a bez louhu. Abychom se vyvarovali tohoto nebezpečí, provětrávali jsme v určitých intervalech pokusné baňky proudem vzduchu.

Naše práce měla především metodické zaměření, a proto uvádíme výsledky měření spíše jen jako příklad funkce přístroje. Stanovení pravidel mineralisace různých látek si vyžádá velkého počtu pokusů daleko složitějších, než jsou uvedené příklady. Tyto příklady jsme volili pouze proto, abychom ukázali rozsah použitelnosti navrženého přístroje.

Autor děkuje Janu Křítkovi a Aleně Reichelové za technickou spolupráci.

Souhrn

V práci jsme popsali přístroj, dovolující po neomezeně dlouhou dobu sledovat průběžně spotřebu kyslíku a produkci kysličníku uhličitého v deseti stogramových nebo větších vzorcích půdy současně, s přesností asi $\pm 2\%$. Citlivost přístroje je podle uspořádání pokusu 0,6 až 0,04 μl na gram vzorku. Teplota je regulována s přesností na desetinu stupně, vlhkost vzorku se prakticky nemění, obsah kyslíku kolísá o $\pm 10\%$ kolem výchozí hodnoty. Uvedli jsme theorii přístroje, způsob použití a popsali několik pokusů, sledujících mineralisaci organických látek podle spotřeby kyslíku.

L i t e r a t u r a

- Gamble, S., Mayhev, C., Chappel, W.: *Respiration rates and plate counts for determining effects of herbicides on heterotrophic soil microorganisms*. Soil Sci. 74 : 347, 1952.
- Chase, F. E.: *Use of the Warburg respirometer to study microbial activity in soils*. Nature 171 : 481, 1953.
- Johnston, D. R.: *A laboratory study of the decomposition of vegetable debris in relation to the formation of raw humus*. Plant and Soil 4 : 345, 1953.
- Kleinzeller, A., Málek, J., Vrba, R.: *Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii*. Praha, 1954.
- Lees, H.: *A simple apparatus for measuring the oxygen uptake of soils*. Plant and Soil 2 : 123, 1949.
- Lees, H.: *A percolating respirometer*. Nature 166 : 118, 1950.
- Rovira, A. D.: *Use of Warburg apparatus in soil metabolism studies*. Nature 172 : 29, 1953.
- Swaby, R. J., Passey, B. I.: *A simple macrorespirometer for studies in soil microbiology*. Austral. J. Agric. Res. 4 : 334, 1953.

Использование респирометрии в микробиологии почвы. I.

Методика макрореспирометрии

Я. Дробник

Р е з ю м е

Описывается аппарат, позволяющий в течение неограниченно долгого времени непрерывно следить за потреблением кислорода и продукцией углекислого газа одновременно в 10 образцах среды (весом по 100 гр или больше) с точностью до $\pm 2\%$. Чувствительность аппарата колеблется, в зависимости от постановки опыта, от 0,6 до 0,04 $\mu\text{л}$. на 1 гр образца. Температура регулируется с точностью до 0,1°, влажность образца остается практически неизменной, отклонения содержания кислорода от исходной величины составляют $\pm 10\%$. Излагается теория аппарата и способ его применения. Описано несколько опытов по исследованию минерализации органических веществ в зависимости от потребления кислорода.

The Use of Respirometry in the Microbiology of Soil. I.

A Method of Macrorespirometry

J. Drobnik

S u m m a r y

The communication describes an apparatus which makes it possible to carry out for an indefinite period a parallel study of the consumption of oxygen and production of carbon dioxide in ten 100 g. specimens (or larger specimens) of soil simultaneously, with a degree of precision of approximately $\pm 2\%$. Sensitivity is from 0.6 — 0.04 μl . /g. specimen, according to the arrangement of the experiment. The temperature can be regulated to within 0.1°, the degree of moisture of the specimen remains practically unchanged and the oxygen content varies within the limits of $\pm 10\%$ of the initial value. An account is given of the principle of the apparatus, together with the method of use, and a number of experiments studying the mineralisation of organic substances according to oxygen consumption are described.

R e c e n s e

Perspectives and Horizons in Microbiology

A Symposium edited by S. A. Waksman, Rutgers's University Press, Brunswick 1955.

Tato velmi zajímavá knížka je souborem přehledů podaných na sympoziu, pořádaném při založení mikrobiologického ústavu na Rutgers University v New Brunswicku v USA, několika nejvýznamnějšími mikrobiology z různých úseků mikrobiologie. Knižka podává nejen přehled zaměření tohoto základního ústavu, ale i hlavní linie obecné mikrobiologie a základního výzkumu v mikrobiologii vůbec. Tím je její obsah pro nás poučný a podnětný a jistě nás musí vést k tomu, abychom konfrontovali náš rozvoj v mikrobiologii s tím, co knížka podává. Ústav si stanoví velké úkoly. Waksman ve svém závěrečném projevu je shrnuje: „Tento ústav zasvětil své úsilí studiu nejmenších forem života, mikrobů, ať se nacházejí kdekoliv a vyvíjejí jakoukoliv činnost. Nechť tento ústav je střediskem, kde se budou soustřeďovat vědci se všech stran světa k práci, učení i studiu. Pracovní ústavu jsou určeny svobodnému rozvoji vědeckého poznání pro blaho lidstva.“ Ústav chce být jakýmsi doplňkem Pasteurova ústavu na poli obecné mikrobiologie, mikrobiální systematiky, fyziologie, biochemie, cytologie, genetiky atd.

Příznačná a svým zaměřením podnětná je přednáška *Cornelis B. Van Niela: Mikroby jako celek*. Autor v ní varuje před tím, aby „obecná“ mikrobiologie nebyla ztotožňována s biochemií a aby jediná linie studia mikroorganismů nebyla v biochemickém výzkumu. Nepodceňuje, co může dát biochemie výzkumu mikroorganismů a obráceně, ale zdůrazňuje komplexnost projevů mikroorganismů, jejich organizace, růstu, jak odpovídají na zevní činitele dráždivosti, proměnlivosti a přizpůsobivosti. Tyto projevy nepoznáme „studiem jen izolovaných fragmentů organismu“. Uvádí pro to příklady z otázek permeability, adaptací a mutací, pohyblivosti atd. Zdůrazňuje nutnost studia nejen celých, živých buněk, ale i populací, a to nejen čistých, ale i smíšených. Varuje před experimentálními artefakty (na př. varuje před přílišnou důvěrou v práci s kulturami získanými z jedné buňky: „dokonce ani populace získané z jedné buňky nejsou zdaleka homogenní“).

Další přednáška známého pracovníka z Pasteurova ústavu *A. Lwoffa („Some Aspects of Metapoeitic Integrations“)* zdůrazňuje důležitost studovat mezi jinými proměnami mikroorganismů otázku lysogenie; bakteriofág totiž v podobě profágu je pravděpodobně v tak těsném svazku se strukturami, které ovládají dědičné vlastnosti bakterií, že již svou přítomností vyvolává změny, které právě Lwoff nazývá „metapoeitickými“.

Na tuto přednášku navazuje referát známého mikrobiálního genetika *J. Lederberga (Genetics and Microbiology)*, v němž jsou příznačné některé jeho názory. Především uvádí svou lekcí Dubosovou poznámku, naplněnou skepticismem k formální genetice („Bakterijní proměnlivost přechází nyní ze sběratelské skříňky přírodovědce do sofistikované atmosféry biochemické laboratoře“); dále varuje před přílišným zjednodušováním poznatků s bakteriálními kulturami při genetickém hodnocení („běžné kultační metody přináší stálou změnu chemického prostředí dodatkem k nevyčerpateľné zásobě systematických i pořádacích chyb“), zdůrazňuje důležitost průtokových metod v podobě t. zv. chemostatu, jak jej vypracoval Novick se Szilardem pro studium proměnlivosti („spontánních mutací“); říká: „sofistické studie bakteriálních mutací nemohou dále nepřihlížet k možnosti jejich experimentálního ovládní s této strany“ a dodává: „spontánní (přes záměrné nepochopení dialektických materialistů ! !) neznamená . . . , že genetický materiál postrádá fyzické spojení s okolím“ (! !). Ostatně „pokusy s chemostatem ukázaly významný vliv zevního prostředí na výskyt sporadických mutací . . .“ Mluví také o genetických rekombinacích, transdukcích a zdůrazňuje význam jejich studia.

B. D. Davis ve svém referátě (*Nutritional and Enzymatic Studies on Microbial Mutants*) hodnotí otázku uměle získaných t. zv. auxotrofních mutantů pro studium metabolických cest u bakterií a tím i pro poznání základních procesů přeměny látek vůbec. Ukazuje to na příkladu studia syntesy aromatických sloučenin a hodnotí, za jakých podmínek lze soudit, že nám mutantů odhaluje skutečné intermediární metabolity. Zdůrazňuje, že k takovému závěru nestačí, ukáže-li se, že je růstovou látkou, nebo je-li auxotrofní mutantou hromaděna. Již pevnější je závěr, podaří-li se z původního, „divokého“ kmene získat enzym, který tuto látku rozkládá a který není přítomen v použité auxotrofní mutantě. Avšak i pak je třeba zdůraznit, že skutečné intermediární látky mohou být nestálé nebo vázané a nemusí být přítomny nikdy více než jen ve stopách. Látky, které se odhalí jako růstové látky nebo se hromadí, mohou být jen odpadovými deriváty, jen „bledé odrazy živé skutečnosti.“

Na základě takového kritického přístupu pak hodnotí získané poznatky o syntese fenylalaninu a uzavírá, že pravděpodobně kys. fenylpyrohroznová a preferonová (PPA) jsou skutečnými normálními intermediárními látkami. Podobně je PPA asi prekursorem tyrosinu, kdežto o kyselině fosfošikimové soudí, že je produktem vedlejším, stejně jako kyselina chinová (quinic acid). Přes to, že vychází z hypotese o souvislosti genů a enzymů („one-gene-one-enzyme theory“), sám ukazuje na slabá místa této teorie.

Další stať H. A. Barkera (*Progress and Problems in Bacterial Metabolism*) se zabývá obecně otázkami studia bakteriálního metabolismu jak s hlediska nových metodických přístupů, tak dosažených výsledků i významu pro řešení obecných otázek metabolismu vůbec. Ukazuje, jak z původní, čistě průzkumné práce na poli obecné mikrobiologie se začalo užívat jako hlavní metody pokusu bilančního, který poskytl množství závažných kvantitativních údajů o možných cestách fermentace, nemohl však odkrýt skutečný proces s jeho postupem. Jako další stupeň studia uvádí poznání, že za velikou rozmanitostí metabolických procesů u různých mikrobu se skrývá velká podobnost základních procesů. Z novějších metod vymezuje možnosti používání metody isotopů, chromatografie, studia mikrobiálních enzymů, auxotrofních mutantů a zdůrazňuje důležitost t. zv. techniky simultánních adaptací. I u nich však zdůrazňuje, že „metabolické procesy jsou tak dokonale koordinovány, že je obtížno oddělit a identifikovat jednotlivé reakce“. Upozorňuje pak zvláště na nové poznatky o růstových látkách (kyselina lipová, ferrichrom, disacharid glukosy s N-acetyl-glukosaminem) získané hlubším studiem mikrobiální výživy. Upozorňuje též na jiné než glykolytické cesty rozkladu cukrů (cesta kyseliny glukonové, ribuloso-fosfátu, 2-keto, 3-desoxy 6-fosfoglukonátu), na nové poznatky při studiu trikarboxylového cyklu, energií bohatých sloučenin (přítomnost jiných typů cytochromů a cytochromoxydasy u bakterií, přítomnost cytochromových složek u anaerobních bakterií redukujících sulfát). Ukazuje na důležitost studia procesů biosyntesy. Jako úkol pro mikrobiology stanoví studovat *obecné projevy života na metabolismu bakterií*.

Stať J. W. Fostera (*Molds as Metabolic Models*) ukazuje na perspektivy výzkumu hub. Zdůrazňuje, že není účelné oddělovat metabolismus hub od metabolismu bakterií, poněvadž mají mnoho podobného a společného; bohužel studia hub bylo použito nepoměrně méně než bakterií, ač má starou tradici — hned od dob Pasteurových. Hlubší studium bohatého kaleidoskopu katabolických reakcí, které jsou schopny uskutečňovat houby, může přinést velký prospěch nejen theoretický, ale i praktický. Je však k tomu třeba daleko více hledat v přírodě, na přirozených nalezištích hub, poněvadž sbírkové kmeny byly většinou sbírány a vedeny jednostranně, a používat nových způsobů izolace. Jako příklad takových neočekávaných nálezů uvádí nález plísně, které stačí ethan jako jediný zdroj C. Stejně tak syntetické pochody u plísní zasluhují pozornosti a studia. Předpokládá, že i plísně jsou schopny užívat sloučenin s 1–3 uhlíky jako základu syntesy.

Jako další je zařazena stať známého W. W. Umbreita (*Metabolic Pathways*). Hodnotí v ní základní typy metabolických procesů v buňce. Upozorňuje na 3 charakteristické rysy: 1. Velká část chemismu buňky se uskutečňuje nikoliv syntesou de novo, nýbrž daleko ekonomičtějším způsobem, t. j. přenosem nebo výměnou chemických skupin. 2. Chemické procesy tvoří řetězce, v nichž začátek velmi pevně určuje průběh celé řady dalších článků. Při tom vyslovuje domněnku (o které sám říká, že snad vypadá mechanisticky nebo málo uspokojivě), že adaptace je jen výměna již hotových metabolických stezek a kompetice mezi nimi, nikoliv jejich změna. 3. Charakteristické jsou procesy cyklické. Pro jednotlivé metabolické procesy existují alternátní, ale nepočetné stezky. Proto i metabolisování různého výchozího materiálu dostává vždy jednotný směr. To asi platí nejen o rozkladu, ale i o syntese a je odrazem jistých jednotných principů v živé přírodě. Závěrem zdůrazňuje význam mikrobiologie pro obecné studium přeměny látkové, neboť při metodické jednoduchosti dává možnost studia velmi rozličných pochodů.

P. W. Wilson (*Pathways in Biological Nitrogen Fixation*) podává přehled o historii studia biologické fixace dusíku, o jeho výzkumných stezkách a výhledech; zde zdůrazňuje hlavně důležitost isotopové techniky.

Stať D. H. Petersona (*Microorganisms and Steroid Transformations*) seznamuje s poměrně novým úsekem, v němž mikrobiologie zasahuje do praxe i teorie chemické syntesy: podává přehled i výhledy přeměn farmakologicky důležitých steroidů pomocí mikroorganismů. Ukazuje, že i při pokročilé úrovni chemické syntesy jsou přeměny, které lze nepoměrně ekonomičtěji provádět pomocí mikroorganismů. Tím se obrací pozornost na nový způsob využití mikroorganismů, který již nyní, za poměrně krátkou dobu, dal pozoruhodné výsledky: biologické přeměny steroidů se dnes používá na př. při výrobě kortizonu, hydrokortizonu, estronu, testosteronu.

Ve třetí části symposia jsou soustředěny přehledy, týkající se vztahu mikroorganismů a vyšších forem života. Z nich jeden se týká vztahu mikrobu k rostlinám, ostatní jsou věnovány jejich vztahu k člověku a boji s nimi.

Přehled Starkeyův (*Microorganisms and Plant Life*) ukazuje, jak málo je probádána otázka vztahu mikroorganismů a rostliny, tak důležitá pro otázky zemědělství. Není vyjasněna úloha mikroorganismů v rhizosféře, a to ani pokud se týče vlivu rostliny na mikroby, ani obráceně; je nedostatek poznatků o tom, co se děje na povrchu kořenů, neúplně jsou znalosti, co kořeny secernují i co z produktů mikrobních jsou schopny přijímat. Dále podává přehled o významu a studiu mykorhizy a bakteriorhizy, přechází k parasitismu, při němž se zastavuje u otázky, co je imunita rostlin, jaká je role taninu a fenolů vůbec a i fytoncidů. Nakonec hodnotí význam antibiotik pro rostlinu: mohou být přijímány rostlinou a přenášeny v ní, nesporně mají příznivý vliv na klíčení a rané fáze vývoje rostlin.

Známy badatel mikrobiálních polysacharidů Heidelberger hodnotí nejdůležitější *nevyřešené otázky imunologické* (*Some Unsolved Problems in Immunology*): Místo a způsob tvorby protilátek; v čem spočívá specifita bílkovinných antigenů, zvláště specifčnost antigenních uhlovodanů, složení a specifita

antigenů krevních skupin, podstata, mechanismus i kinetika účinku komplementu, vztah alergie a imunity (2 různé protilátky β -globulin — sensibilisující, a γ -globulin — neutralisující), podstata a specifická alergienů. O budoucnosti imunologie říká: „Moderní kvantitativní imunochemické metody přinášejí a budou dále přinášet mocné zbraně, které přinesou konečné řešení“.

Nerozřešenou otázkou *chemoterapie virových nákaz* se zabývá ve svém přehledu Horsfall F. L. Jr. (*The Inhibition of Virus Reproduction by Chemical Substances*). Otázkou je již mechanismus množení virů: množí se nebo jsou množeny? I u virů vidíme období lag-fáze a pak logaritmické množení, jehož rychlost a tím i množství viru závisí na oxidačním metabolismu. Uvádí látky, které inhibují množení bakteriofágů: proflavin zasahuje až nitrobuněčný proces, takže zasahuje pozdě, účinnější je 5-methyl-tryptofan, který jej inhibuje v rané fázi, podobně i chloramfenikol. Ale zkušenosti s bakteriofágy nelze přenést na ostatní viry, neboť podstata jejich účinku i množení je jiná. Proti nim jsou nejslibnější analoga aminokyselin a purinů: 5,6-dichlorderivát benzimidazolribofuranosidu (blízký B_{12} a adenosinu) brzdí nitrobuněčné množení, nemá při tom účinek na oxidační metabolismus buňky; méně účinný je 2,5-dimethylimidazol. Zajímavé je, že pouzderný polysacharid klebsiely specificky léčí smrtelné onemocnění myši pneumonií (zasahuje asi již během inkubace).

Eagle H. se zabývá problémy výzkumu antibiotik (*Challenging Problems in Antibiotic Research*). Uvádí tyto otázky: Použití antibiotik ve výzkumu; Problémy resistantních kmenů, zvláště stafylokoků; Antibiotika proti červům, prvokům a virům; Permeabilita buněk jako možný limitující faktor; Toxicita antibiotik (přecitlivělost proti penicilinu, gastrointestinální poruchy po tetracyclinech, krevní dyskrasie po chloramfenikolu). Podstatu vzniku resistance jako obecné biologickou otázku vidí v selekci resistantních kmenů ze spontánně vzniklých mutantů a nikoliv v jejich vzniku pod účinkem antibiotik; sám však upozorňuje, že takto nelze vysvětlit vznik resistantních kmenů po malých dávkách. O citlivosti na penicilin soudí na základě svých pokusů, že závisí na schopnosti vázat penicilin — množství vázaného penicilinu, které zabíjí, je konstantní (1500–2800 molekul, t. j. asi 1,4–2,2 μg na 1 buňku).

Za další nevyřešenou otázku pokládá podstatu účinku antibiotik. O dalším vývoji výzkumu antibiotik soudí, že je důležitější studovat fyziologický význam antibiotika pro samého jeho producenta, než zkoušet všechny možné filtráty z plísni a aktinomycet na antibiotickou účinnost. Vůbec o dalším vývoji chemoterapie říká, že „je třeba hledat nový přístup a novou orientaci, má-li hledání mít stále rostoucí produktivitu“.

Zajímavý je i závěrečný projev Waksmanův (*Microbiology Takes the Stage*), v němž se zamýšlí nad některými základními otázkami perspektivy mikrobiologie a vědy vůbec. Poněvadž ústav se bude zabývat i mikrobiologickou výukou, zamýšlí se nad výchovou budoucích vědců. Jsou při tom dva typy výchovy: první se stará naplnit kandidáta vědomostmi, druhý se snaží přesvědčit jej o tom, že ví velmi málo. Druhý je obtížnější, ale lepší. O zaměření ústavu říká, že se bude řídit příkladem Pasteurovým: věda a její aplikace jsou nerozlučně spojeny; nebude pěstovat proto ani jen „čistou“, „základní“, ani jen aplikovanou a praktickou vědu.

Pro nás, kteří začínáme rozvíjet perspektivy rozvoje naší mikrobiologie, je tedy knížka plná poučení. V některých bodech, a to ne výjimečných, se náš program shoduje s programem, který je nastíněn v symposiu, v jiných (studium metabolických cest, genetiky, studium plísni) nás nabádá, abychom svou práci prohloubili a více rozvinuli. V některých otázkách máme na své úkoly názory alespoň částečně odlišné (otázky imunologické, úkoly genetiky). Každý mikrobiolog v ní však jistě najde mnoho podnětů.

Akademik Ivan Málék

Z p r á v y

Doc. Ph. Dr František Straňák zemřel

Dne 15. II. 1957 zemřel doc. PhDr František Straňák (narozen 5. XII. 1875 v Boskovicích). Studoval gymnasium v Litomyšli, kde maturoval v roce 1896. Na Karlově universitě v Praze studoval pak botaniku, geologii, palaeontologii a filosofii a studia ukončil doktorátem z botaniky v roce 1909. Byl jedním z prvních našich mikrobiologů a také jeho habilitační práce byla z tohoto oboru — bakterios bramborů. Habilitoval se na Vysoké škole zemědělského a lesního inženýrství v roce 1917. Po studiích na universitě působil krátkou dobu jako gymnasiální profesor. Nespokojil se tímto úřadem. Proto už v roce 1907 přechází do výzkumnictví, které bylo tehdy skutečně v plenkách a vyžadovalo většího nadšení, skromnosti a dobrovolného zřeknutí se jiné, úspěšnější kariéry. Nastoupil tehdy místo bakteriologa a fytopatologa na Výzkumné stanici hospodářsko-fysiologické při českém odboru tehdejší Zemědělské rady v Praze, s několika význačnými jinými pracovníky byl tam asistentem prof. Dr Julia Stoklasy. Po roce 1918 počal budovat fytopatologický ústav — ústav pro ochranu rostlin — v rámci tehdy nově zřizovaných Státních výzkumných ústavů zemědělských (pro výrobu rostlinnou) v Praze. Byly to skromné začátky, ve kterých tehdy Straňák ve staré Grebovce začínal. Ústav, kterému připadaly tak velké úkoly, byl v jediné místnosti, nebylo pracovníků. Ale Straňákovi se podařilo dlouholetou práci vychovat kádry, vybavit ústav a pozvednout jej na úroveň evropského měřítka. V roce 1928 se ústav přestěhoval do Dejvic a Straňák jej vedl až do svého odchodu do důchodu, do 1. III. 1939. Ale ani na zaslouženém odpočinku Straňák neodpočíval. Pracoval na akcích pro získání zdravých bramborových sadeb, na uznávání osiva a sádí, spolupracoval s tehdejší Ústavem pro ochranu rostlin, později s fytopatologickým oddělením Biologického ústavu ČSAV, Kontrolním ústavem min. zemědělství a všude tam, kde byly právem vyhledávány jeho bohaté zkušenosti. O jeho živém zájmu o současný pokrok vědeckého bádání svědčí i jeho přednáška, kterou — přes svůj vysoký věk — přednesl na celostátní konferenci o mikrobiologii půdy v únoru 1954 v Liblicích.

Straňák byl skromný vědecký pracovník. Nechlebil se tím, že vykonal důležité práce mikrobiologické, že k nám zaváděl moderní fytopatologii a její praktickou aplikaci, ochranu rostlin, ve prospěch celého státu.

Straňák začal jako odvážný botanik — probádal květenu tehdy ještě nedostupné propasti Macochy a Sloupských jeskyní (1906—1907). Jeho práce z let 1907—1910 z mikrobiologie půdy, týkající se zejména otázek azotobaktera a jeho záměrného použití pro zvýšení úrodnosti půdy a zvýšení výnosů, zůstávají i dnes pracemi základními. Ale již v roce 1907 poznává Straňák svoje hlavní poslání: uvést k nám pokrokovou ochranu rostlin. Přechází proto brzy, již v roce 1908, na pole patologie a ochrany rostlin. Do roku 1938 uveřejnil Straňák přes 200 vědeckých a vědecko-populárních prací z celého obrovského pracovního pole těchto oborů, z oboru mikrobiologie, mykologie, abiotické patologie, virologie i entomologie a j. Ovládá tento nový a obtížný obor v měřítku skutečně světovém a také v něm uplatňuje světová hlediska. Z vědeckých prací nemohu se nezmínit alespoň o některých: o řepných nematodech, bakteriosách rostlin, americkém padlí angreštovém, resistenci rostlin vůči chorobám a škůdcům, o mouše burákové, vlivu ultrafialových paprsků na vegetaci, o třásněnkách, klejotoku ovocných stromů, o červcích na ovocných stromech, o obilných rzích, o přípravách na ochranu rostlin, o boji proti hrabošům, o radioaktivních hnojivech, o organizaci ochrany rostlin, o snětivostech obilí a boji proti nim, o toxickém vlivu terpenů na vegetaci podrostů v jehličnatých lesích, o použití otravných plynů k hubení živočišných škůdců, o moření osiva, o rakovině bramborů, o virových chorobách, zvláště o mosaice révy vinné, o některých škodlivých dipterech, o spále řepy, o mandelince bramborové, o mandelince hlaváčkové, o suchých mořidlech, o chorobách a škůdcích lnu, o mýše gama, o panašování révy vinné. Úmyslně jsem uvedl tento výčet neuspořádaný podle oborů tak, jak to vyžadovaly problémy, také neuspořádané se vyskytující.

Pro zavádění a organizaci ochrany rostlin a rostlinářské služby, jakožto důležitého odvětví zemědělské praxe i správy, obětoval Straňák mnoho času, který by byl jinak mohl věnovat práci vědecké. Právem jsme ho považovali za jednoho ze zakladatelů systematické ochrany rostlin u nás. V době, ve které se dály v ochraně rostlin změny rázu revolučního, kdy bylo u nás třeba se bránit rakovině bramborů, nebezpečným chorobám osiva, kdy se organizovalo uznávání plodin pro získání jakostních osiv a sádí, byl Straňák vždy na svém místě. Zavádění postřiků chemickými přípravky u stromů a keřů, úspěšný boj proti rakovině bramborů, moření osiva obilovin suchou a mokrou cestou, boj proti virosám rostlin, úspěšné zmáhání hrabošů kalamit, to byly velké přínosy na cestě, kterou Straňák šel ve prospěch lidu. Straňák, přesný realista ve vědě, objevoval důležité nové věci na základě solidního faktického materiálu, nepodceňoval při tom práci popularizační, publikační a přednáškovou i práci v nejrůznějších veřejných institucích. Těž proto se živě uplatnil v naší odborné práci zákonodárné a vybudováním pokrokové služby ochrany rostlin přispěl k zařazení naší vlasti mezi pokročilé země.

Na základech jeho práce jsme budovali my, abychom zase, až náš čas dospěje, práci předali rozvětvené a specialisované skupině mladých pracovníků.

Straňák jako vysokoškolský učitel mohl své schopnosti a znalosti uplatnit jen částečně. Ale v ostatní své činnosti, zakládaje své učební metody na pěti nezbytných vlastnostech: ušlechtilosti v jednání, lásce k povolání, ovládnutí látky, svobodě bádání a kritické, ale laskavé přisnosti, vychoval řadu odddaných žáků. Vážili si ho — a jsem štaten, že se k nim mohu počítat — nejen jako laskavého vedoucího, ale též jako dobrého člověka a otcovského přítele.

Straňák, skromný a nenáročný člověk, svou prací prospěl mnoha zemědělcům v našem státě, přispěl tak k jejich lepšímu životu.

Jeho práce nebude zapomenuta !

Ctibor Blatný
člen-korespondent ČSAV

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 20. dubna 1957. - A-28147

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Рокос, И., Бургер, М., Прохазка, П.: Влияние хлортетрациклина на активность α -амилазы производственного штамма <i>Actinomyces aureofaciens</i>	65
Кнедлгансова, Э.: К вопросу экспериментального изучения возникновения перекрестной устойчивости у стафилококков (<i>Micrococcus pyogenes</i>)	71
Винтер, В.: Спорообразование бацилл. IV. Воздействие цистеином и цистином на образование спор у <i>Bacillus megatherium</i>	80
Йогановский, Ю.: Значение хлорьеобразующего фактора (clumping factor) для патогенности стафилококков	90
Штерцль, Я.: Перенесение образования антител клетками полиморфонуклеарного эксудата	96
Голубь, М.: Иммунологические и гистологические изменения при иммунизации липидным adjuvans	103
Дробник, Я.: Использование респирометрии в микробиологии почвы. I. Методика макрореспирометрии	116
<i>Рецензии</i>	124
<i>Хроника</i>	127

C O N T E N T S

Rokos, J., Burger, M., Procházka, P.: The Influence of Chlortetracycline on the Activity of α -amylase of the Production Strain <i>Actinomyces aureofaciens</i>	65
Knedlhansová, E.: Experimental Contribution on the Development of Cross Resistance in Staphylococci (<i>Micrococcus pyogenes</i>)	71
Vinter, V.: Sporulation of Bacilli. IV. The Effect of Cystine and Cysteine on Spore Formation in <i>Bacillus megatherium</i>	80
Johanovský, J.: The Significance of the Clumping Factor for the Pathogenicity of Staphylococci	90
Šterzl, J.: The Transfer of Antibody Formation by Means of the Cells of Polymorphonuclear Exudate	96
Holub, M.: Immunological and Histological Changes in Immunization with a Lipoid Adjuvant	103
Drobnik, J.: The Use of Respirometry in the Microbiology of Soil. I. A Method of Macrorespirometry	116
<i>Critiques</i>	124
<i>News</i>	127