

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

ČESKOSLOVENSKÁ
MIKROBIOLOGIE

ROČNÍK

2

ČÍSLO

4



ČS. MIKROBIOL.

PRAHA, ČERVENEC 1957 · STR. 193—260

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

Šilhánková, L.: Působení povrchově aktivních látek na drsné a hladké formy kvasinek	193
Málek, I., Burger, M., Hejmová, L., Řičica, J., Fencl, Z. a Beran, K.: Asimilace cukrů a kyselin při kontinuálním zdroždování neředěných sulfitových výluhů	203
Arpai, J.: Selekted práce na váhové diferencovaných konídiách huby <i>Aspergillus terreus</i> Thom. I. Samovolná nerovnocennost spór čisté kultúry	213
Fencl, Z., Burger, M. a Beran, K.: Amylytická účinnost mycelia plísně <i>Aspergillus niger</i> odpada- jícího při výrobě kyseliny citronové	221
Bomar, M.: Příspěvek k zjišťování účinnosti fungitoxických sloučenin	228
Seifert, J.: Vliv jedlového porostu na biologický stav půdy	234
Ševčík, V. a Podojil, M.: Orientační stanovení iontového charakteru antibiotik plotnovými testy	238
Ševčík, V. a Vrtišková, A.: Pronikání antibiotik dialyzační membránou na agarových plotnách	242
<i>Krátká původní sdělení</i>	
Vinter, V.: Sporulace bacilů. V. Inhibice tvorby spor cystinem u některých zástupců rodu <i>Bacillus</i>	246
Lysenko, O.: Možnost přenosu mikroorganismů metamorfosou pakomára <i>Chironomus plumosus</i>	248
<i>Předběžná sdělení</i>	
Rokos, J. a Procházková, P.: Vztah metabolismu různých uhlohydrátů k produkci chlortetracyklinu u kmene <i>Streptomyces aureofaciens</i>	251
<i>Zprávy</i>	254

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

ročník 2. (1957) — č. 4

Působení povrchově aktivních látek na drsné a hladké formy kvasinek

LUDMILA ŠILHÁNKOVÁ

Biologická katedra, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

Došlo 15. 1. 57

V předešlé práci (Šilhánková 1956) jsme zjistili, že drsné formy kvasinek, podobně jako drsné formy bakterií, jsou citlivější vůči cholátu sodnému než formy hladké, neboť jsou úplně inhibovány při koncentracích, při kterých se hladké formy rozmnožují téměř normální rychlostí. Jelikož podle Stacey a Webba (1947) souvisí inhibiční efekt žlučových kyselin úzce se snižováním povrchového napětí, zjišťovali jsme, zda i jiné povrchově aktivní látky mají podobný účinek a zda tento účinek souvisí s jejich povrchovou aktivitou.

Účinnost povrchově aktivních látek na mikroorganismy byla sledována četnými autory, avšak výsledky jejich prací se často značně liší, takže dosud nebyl úplně objasněn mechanismus působení těchto látek. Přehled tohoto tematu podává Glassman (1948), který referuje o pracích sledujících účinnost povrchově aktivních látek na bakterie a viry. Vliv kationaktivních detergenčních prostředků na kvasinky studovala Komarova (1953), která zjistila, že fungicidní účinnost těchto látek závisí mimo jiné na velikosti inokula a na míchání kvasného substrátu. Shibasaki a Terui (1953) zjistili, že koncentrace povrchově aktivních látek inhibující kvašení se liší od koncentrace inhibující rozmnožování kvasinek a že obě závisí na složení media.

Materiál a metody

Použité kvasinky. Pracovali jsme se samovolně dissociovanými kulturami kvasinek: s kvasinkou *Saccharomyces fragilis*, lihovarskou kvasinkou a dvěma kmeny vinařských kvasinek, z nichž byly získány čisté drsné a hladké formy (Šilhánková 1956). Z křísotvorných kvasinek jsme použili *Hansenula anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Hansenula Schneggii* a *Candida mycoderma*. Používané kultury byly před každým pokusem dvakrát po sobě kultivovány vždy 48 hodin na sladince při 30 °C.

Použité povrchově aktivní látky. Z kationaktivních činidel jsme zkoušeli Ajatin Spofa (10% vodný roztok dimethylaurylbenzylamoniumchloridu), dále Katexol-298 (laurylamidoethylpyridiniumchlorid) a Syntex-20 (směs Katexolu-298 s kondenzačním produktem kyselin zmydelněného kokosového tuku s monoethanolaminem, oboje vyráběné pro textilní účely firmou Chemotex, Boletice).

Z anionaktivních činidel jsme použili alkylsulfátů obchodních značek Texapon, Syntex L v prášku (asi 30% laurylsulfát), Santomerse (myristylsulfát) a sulfonovaných preparátů značek Tergitol (sulfonovaný sekundární alkohol), Neokal (butyl-naftalensulfonan), Aralkal (alkylarylsulfonan) a 48% alkylarylsulfonan výzkumné výroby Severočeských tukových závodů. Dále jsme zkoušeli Retardon A (kondenzační produkt chloridů vyšších mastných kyselin se štěpnými produkty bílkovin). Všechny tyto látky byly vyráběny pro průmyslové účely. Vyšší mastné kyseliny jakožto nejjednodušší anionaktivní povrchově aktivní látky nemohly být zkoušeny pro svou nerozpustnost v kyselém prostředí, jež je nutné pro kultivaci kvasinek.

Jako neionogenní povrchově aktivní látky byly zkoušeny kondensáty polyethylenoxydu s mastnými kyselinami nebo vyššími alkoholy, a to Tween-80 (polyoxyethylenový derivát sorbitolmonoolejanu), Emulfor (di-(heptyl-isoheptyl)-fenol kondensovaný s ethylenoxydem), Eryfor El (kondenzační produkt

ricinového oleje se 40 mol. ethylenoxydu) a Eryfor-0-100% (kondensát 1 mol. vyššího mastného alkoholu, převážně oleylalkoholu, s 20 – 25 mol. ethylenoxydu). Eryfor E1 a Eryfor-0 jsou výrobky Nováckých chemických závodů.

Použité roztoky povrchově aktivních látek byly připraveny rozpuštěním činidel za aseptických podmínek ve sterilní destilované vodě a nebyly již sterilovány. Koncentrace těchto činidel v živné půdě je udána v procentech prodejného produktu, koncentrace Ajatinu jsou udávány v mg% dimethylaurylbenzylamoniumchloridu.

Živné prostředí a kultivační technika. Jako živného prostředí jsme použili sladinky o koncentraci 8 °Bg, pH 4,5 a 6,5, případně ztužené 2 % agar; pH bylo po sterilaci vždy znovu upravováno. Roztoky povrchově aktivních látek byly pipetovány do Petriho misek a přelity přesným objemem rozehráté sladinky s agarem, nebo byly pipetovány do zkumavek s přesným objemem sladinky. U kontrol byly roztoky nahrazeny stejným objemem sterilní destilované vody. Kvasinky jsme očkovali z tekuté půdy, a to čárkováním na utuhlou živnou půdu ztuženou agarem a pipetováním 0,5 ml suspence narostlých kvasinek do půdy tekuté. Inkubační teplota byla 30 °C. Růst obvykle sledován ve 24 hodinových intervalech.

Počítání buněk. Živé buňky jsme počítali deskovou kultivační metodou. U drsných forem byla suspence pipetována na utuhlou půdu, aby bylo ihned patrné, zda vyrostlé kolonie jsou drsné. Pro kvantitativní sledování pokusů byla kultura ředěna na žádaný počet buněk podle přímého počítání buněk Thomovou komůrkou.

Povrchové napětí jsme měřili při teplotě 20 °C Traubeho stalagmometrem z váhy kapek odkapávající tekutiny. Specifická váha roztoků byla stanovena sadou hustoměrů.

Výsledky

Účinek kationaktivních detergentních činidel

U všech zkoušených kationaktivních činidel došlo k úplné inhibici drsných forem kvasinek na sladince ztužené agarem při koncentracích, jež se u hladkých forem inhibičně neprojevovaly. Výsledky pokusů s rozisolovanými hladkými a drsnými formami kvasinek *S. fragilis*, lihovarské kvasinky a vinařských kvasinek, čárkovány na sladince s agarem a příslušnou koncentrací činidel na Petriho misku,

Tab. 1. Vliv Ajatinu na rozmnožování drsných a hladkých forem kvasinek na sladinkovém agaru

Koncentrace Ajatinu mg%	pH 4,5			pH 6,5		
	Povrchové napětí media (v dyn/cm)	Růst drsných forem	Růst hladkých forem	Povrchové napětí media (v dyn/cm)	Růst drsných forem	Růst hladkých forem
0	56,8	+ + + +	+ + + +	61,5	+ + + +	+ + + +
0,25	56,4	+ + + +	+ + + +	61,0	+ + + + až + + + +	+ + + +
0,50	56,2	+ + + +	+ + + +	60,5	— až +	+ + + +
1,00	55,7	+ + + +	+ + + +	59,5	—	+ + + +
2,50	54,4	+ až + +	+ + + +	57,2	—	+ až + + +
5,0	51,6	—	+ + + +	53,4	—	—
10,0	49,5	—	+ + +	50,0	—	—
20,0	46,9	—	— až + + *	47,4	—	—
40,0	42,7	—	—	44,6	—	—

* Růst nastává jen u lihovarské kvasinky.

Použito hladkých a drsných forem kvasinek: *S. fragilis*, lihovarská kvasinka, 2 kmeny vinařských kvasinek. Čárkováno na sladinku s agarem a příslušnou koncentrací činidel na Petriho misku.

Kultivováno 72 hod. při 30 °C

Hodnocení růstu: + + + + velmi dobrý růst po celé délce nátěru; + + + růst je poněkud zpomalen; + + růst jen v izolovaných koloniích, nikoliv v souvislém nátěru; + přítomno jen několik kolonií; — růst nenastává.

jsou uvedeny v tabulkách 1—3. Hladké formy byly při obou zkoušených pH inhibovány teprve při koncentracích 5 až 20krát vyšších než formy drsné. K inhibici drsných forem došlo při pH 4,5 při koncentraci činidel, jež v tekuté sladince snižují povrchové napětí o 4—6 dyn/cm, při pH 6,5 pak při koncentracích způsobujících snížení povrchového napětí o 2—4 dyn/cm, zatím co koncentrace činidel, způsobující při pH 4,5 úplnou inhibici hladkých forem, snižovaly povrchové napětí sladinky o 14—20 dyn/cm a koncentrace, jež měly stejné účinky při pH 6,5 snižovaly povrchové napětí za těchto podmínek o 8—14 dyn/cm. Z tabulek je tedy zřejmé, že kationaktivní činidla byla na obě formy účinnější v méně kyselém prostředí (pH 6,5). V alkalickém prostředí účinek těchto činidel na kvasinky sledován nebyl, neboť již toto prostředí samo brzdí jejich rozvoj.

Tab. 2. Vliv Katexolu—298 na rozmnožování drsných a hladkých forem kvasinek na sladinkovém agaru

Koncentrace Katexolu (%)	pH 4,5			pH 6,5						
	Povrchové napětí media (v dyn/cm)	Růst drsných forem	Růst hladkých forem	Povrchové napětí media (v dyn/cm)	Růst drsných forem	Růst hladkých forem				
0	56,8	+	+	+	+	61,5	+	+	+	+
0,001	56,0	+	+	+	+	60,3	+	+	+	+
0,0025	55,6	+	+	+	+	58,8	—	+	+	+
0,005	54,6	+	+	+	+	56,2	—	+	+	+
0,010	53,8	+	+	+	+	55,4	—	+	+	až
0,025	50,4	—	+	+	+	52,4	—	+	+	až
0,05	48,4	—	+	+	+	50,0	—	+	+	+
0,10	45,9	—	+	+	+	46,7	—	—	—	—
0,25	39,3	—	—	až	+	+	—	—	—	—
0,50	36,8	—	—	až	+	+	—	—	—	—
1,0	36,3	—	—	—	—	36,3	—	—	—	—

* Růst nastává jen u lihovarské kvasinky.

Použito hladkých a drsných forem kvasinek: *S. fragilis*, lihovarská kvasinka, 2 kmeny vinařských kvasinek. Čárkováno na sladinku s agarem a příslušnou koncentrací činidel na Petriho misce. Kultivováno 72 hod. při 30 °C

Hodnocení růstu jako u tab. 1.

Po morfologické stránce je zajímavé, že myceliovité formy si až do nejvyšší koncentrace činidel, při které se ještě rozmnožovaly, podržely typický drsný charakter kolonií. Podobně i hladké formy měly až do nejvyšších koncentrací činidel kolonie nezměněny, takže nikdy nedocházelo k tvorbě vlhkých, silně lesklých, slizovitých kolonií, jak tomu bylo v přítomnosti neionogenních, povrchově aktivních látek (viz níže). Rovněž tvar buněk zůstal v obou případech podstatně nezměněn.

Koncentrace úplně inhibující drsné formy nesnížily počet kolonií forem hladkých, vyrostlých na sladince ztužené agarem ze suspence o známém počtu buněk, avšak rozmnožování buněk bylo, zvláště u vyšších koncentrací, zpomaleno, což se projevilo ve velikosti kolonií. Tyto koncentrace však úplně inhibovaly i přechodné (SR) formy, které na cholátu sodném tvořily malé lesklé kolonie, jež po přeočkování na živnou půdu bez cholátu získaly opět svůj původní charakter.

Pro inhibici drsných forem kvasinek kationaktivními detergenčními činidly je nutná přítomnost mastného řetězce, způsobujícího povrchově aktivní charakter

těchto látek, což bylo potvrzeno tím, že trimethylbenzylamoniumchlorid, lišící se od Ajatinu jen náhradou laurylu methylem a nemající proto povrchově aktivních účinků, byl na drsné i hladké formy neúčinný. Tento prostředek byl zkoušen do koncentrace 20 mg%, stejným způsobem jako Ajatin.

Normální křísotvorné kvasinky se chovaly k Ajatinu na sladince ztužené agarem různě. *P. membranaefaciens* (zkoušeny 2 kmeny) a *H. Schneggi* byly při obou zkoušených pH (4,5 a 6,5) stejně citlivé jako drsné formy ssedlinotvorných kvasinek, zatím co *H. anomala* (zkoušeny 2 kmeny) a *C. mycoderma* snášely koncentrace stejně vysoké jako formy hladké, avšak tvořily lesklé, rozplývavé kolonie, podobně jako při vyšších koncentracích cholátu sodného. Na obrázcích 3c, d, je uveden jako příklad počínající vznik lesklých kolonií u *H. anomala* v přítomnosti Ajatinu za obou zkoušených pH. Po přeočkování na sladinku ztuženou agarem vznikly z těchto lesklých kolonií již v první pasáži normální drsné kolonie.

Tab. 3. Vliv Syntexu – 20 na rozmnožování drsných a hladkých forem kvasinek na sladinkovém agaru

Koncentrace Syntexu (%)	pH 4,5			pH 6,5												
	Povrchové napětí media (v dyn/cm)	Růst drsných forem	Růst hladkých forem	Povrchové napětí media (v dyn/cm)	Růst drsných forem	Růst hladkých forem										
0	56,8	+	+	+	+	61,5	+	+	+	+	+	+				
0,001	56,3	+	+	+	+	60,2	+	+	+	+	+	+	+	+		
0,0025	55,7	+	+	+	+	59,0	+	až	+	+	+	+	+	+		
0,005	55,0	+	+	+	+	57,6	–				+	+	+	+		
0,010	54,0	+	+	až		54,9	–				+	+	až			
0,025	52,0	+	+	+	+	51,9	–				+	+	+	+		
0,05	49,5	–		+	+	+	48,9	–				–	až	+	+	*
0,10	45,2	–		+	až		45,1	–				–				
0,25	37,1	–		+	+	+	38,1	–				–				

* Růst nastává jen u lihovarské kvasinky.

Použito hladkých a drsných forem kvasinek: *S. fragilis*, lihovarská kvasinka, 2 kmeny vinařských kvasinek. Čárkováno na sladinku s agarem a příslušnou koncentrací činidel na Petriho misce. Kultivováno 72 hod. při 30 °C

Hodnocení růstu jako u tab. 1.

V tekuté sladince došlo k úplné inhibici rozmnožování drsných forem při pH 4,5 koncentrací 1,0 mg% Ajatinu a při pH 6,5 koncentrací 0,5 mg% Ajatinu. Rozmnožování hladkých forem bylo za těchto podmínek úplně inhibováno až při koncentraci 5 mg% Ajatinu. Ve všech těchto případech došlo jen k částečnému usmrcení buněk, takže některé buňky po přeočkování na sladinku ztuženou agarem daly vznik koloniím. Usmrcení všech buněk drsných forem nastalo při pH 4,5 při koncentraci 2,5–5 mg% Ajatinu, při pH 6,5 při koncentraci 1–2,5 mg% a hladkých forem při koncentraci 10–20 mg% tohoto činidla, při obou zkoušených pH. Nutno však podotknout, že sladinka nebyla pufrována. Při nižší koncentraci buněk v mediu (5×10^2 /ml) bylo dosaženo usmrcení všech buněk drsných forem při pH 4,5 již při koncentraci 2 mg% Ajatinu

Účinek anionaktivních detergenčních činidel

Sulfonované preparáty, jež jsou účinnými anionaktivními detergenčními prostředky, se pro selektivní inhibici drsných forem neosvědčily. Úplné inhibice bylo ve všech případech dosaženo u hladkých i drsných forem při stejných koncentracích činidel, a to v širokém rozmezí povrchového napětí (28–39,5 dyn/cm), jak je zřejmé z tabulky 4, i když šlo o látky se značnou povrchovou aktivitou. Jak dalece je inhibice kvasinek jednotlivými prostředky ovlivněna účinkem sulfonové skupiny, nebylo zjišťováno. Je zajímavé, že i při podstatném snížení povrchového napětí nedocházelo vždy k tvorbě lesklých slizovitých kolonií, jak tomu bylo u neionogenních činidel, avšak že si drsné i hladké formy často podržely původní charakter svých kolonií. Jako příklad uvádíme fotografie kolonií drsných forem *S. fragilis* v přítomnosti Syntaponu L (obr. 1d) a Tergitolu (obr. 1e) a lihovarské kvasinky v přítomnosti stejné koncentrace Tergitolu (obr. 2b).

Tab. 4. Koncentrace sulfonovaných preparátů úplně inhibující drsné a hladké formy kvasinek na sladinkovém agaru a příslušné povrchové napětí sladinky, při níž k inhibici dochází

Zkoušený prostředek	Účinná koncentrace (%)	Povrchové napětí (dyn/cm)
Syntapon L	0,2	39,5
Texapon	0,2	35,2
Santomerse	0,8	32,2
Tergitol	0,4–0,8	33,6–30,2
Neokal	0,4	28,0
Aralkar	0,2	32,5
Alkylarylsulfonát (48%)	0,4	28,0

Použito hladkých a drsných forem kvasinek: *S. fragilis*, lihovarská kvasinka, 2 kmeny vinařských kvasinek. Čárkováno na sladinku s agarem a příslušnou koncentrací činidel na Petriho misce. Kultivováno 6 dnů při 30 °C

Rovněž Retardon A se pro selektivní inhibici drsných forem neosvědčil. Úplná inhibice drsných i hladkých forem nastala až při koncentraci 20% tohoto činidla, což odpovídalo povrchovému napětí 33,8 dyn/cm. Retardon však potlačoval poněkud více rozmnožování drsných forem, což bylo patrné z velikosti kolonií, vyrostlých z jedné buňky. Současně způsoboval Retardon postupnou tvorbu lesklých, hladkých kolonií z kolonií drsných (obr. 1f, 2c, 2d), zvláště při vyšším pH. Jelikož si některé z lesklých kolonií podržely svůj charakter po několika pasáží na sladince ztužené agarem, domníváme se, že šlo o formy přechodné (SR).

Účinek neionogenních povrchově aktivních látek

Neionogenní povrchově aktivní látky, vesměs kondensáty polyethylenoxydu s mastnými kyselinami nebo vyššími alkoholy, selektivní inhibici drsných forem nevykazovaly. Tato činidla ani ve vysokých koncentracích a za značného snížení povrchového napětí podstatně nesnižila rozmnožování drsných ani hladkých forem kvasinek na sladince ztužené agarem. Z tohoto důvodu jsme kvantitativně sledovali účinek dvou z těchto látek ve vysoké koncentraci v tekuté sladince. Tween-80 ve zkoušených koncentracích 0,3 a 0,6%, jež odpovídají povrchovému napětí 49,3 a 46,7 dyn/cm ani Eryfor-0 v koncentraci 1%, což odpovídá povrchovému napětí

42,2 dynů/cm však podstatně nesnížily rozmnožování kvasinek, což je v soulase s výsledky uváděnými Dammem (1956).

Na sladince ztužené agarem docházelo v přítomnosti neionogenních povrchově aktivních látek k přeměně drsných kolonií v kolonie hladké, lesklé, jakoby vlhké, které při vyšších koncentracích těchto činidel přecházely v kolonie slizovité (obr. 1g, 2e, f). K podobné přeměně charakteru kolonií docházelo i u normálních křísotvorných kvasinek. Jako příklad uvádíme kolonie *H. anomala* v přítomnosti Eryforu-0 (obr. 3e, f). Hladké formy poskytovaly při těchto koncentracích slizovité kolonie. Přejít od drsných kolonií ke slizovitým postupoval se stoupající koncentrací povrchově aktivní látky přes četná mezistadia (viz obr. 2e, f). Koncentrace činidel a příslušná povrchová napětí, způsobující tvorbu lesklých kolonií, jsou udány v tabulce 5, při čemž u všech pokusů stoupaly zkoušené koncentrace podle geometrické posloupnosti. Z této tabulky je patrné, že tvorba lesklých kolonií není jen funkcí povrchového napětí, neboť na př. u Eryfor-0 začíná při ještě poměrně

Tab. 5. Koncentrace neionogenních povrchově aktivních látek, způsobující tvorbu lesklých kolonií u drsných forem kvasinek

Zkoušený prostředek	Koncentrace (v %) způsobující tvorbu hladkých kolonií	Příslušné povrchové napětí sladinky (v dyn/cm)	Koncentrace (v %) způsobující tvorbu slizovitých kolonií	Příslušné povrchové napětí sladinky (v dyn/cm)
Tween-80	0,2	49,9	0,8	46,7
Emulfor	0,2	48,7	0,4	45,1
Eryfor El	0,5—1,0	41,1—39,0	2,0	38,8
Eryfor 0—100%	0,1—0,2	52,1—47,2	2,0	41,3

Použito čistých drsných forem kvasinek: *S. fragilis*, lihovarská kvasinka a 2 kmeny vinařských kvasinek. Čárkováno na sladinku s agarem s příslušnou koncentrací činidel. Kultivováno při 30 °C 3 až 6 dnů

vysokém povrchovém napětí (52 dyn/cm), zatím co u Eryforu El, jenž je účinnějším detergenčním prostředkem než Eryfor-0, dochází k počínající tvorbě lesklých kolonií až při povrchovém napětí 41-39 dyn/cm.

Tyto lesklé nebo slizovité kolonie po převedení na sladinku ztuženou agarem poskytl již v první pasáži normální drsné kolonie. Tvar buněk slizovitých kolonií se nelišil od původního tvaru buněk.

V tekuté sladince zabraňovaly neionogenní povrchově aktivní látky tvorbě křisu u drsných forem kvasinek, takže se tvořila klkatá ssedlina při dně nádoby. Tento účinek je obdobný známému působení povrchově aktivních látek na bakterie tvořící blanky na tekutých substrátech.

Účinek jiných desinfekčních prostředků

Jelikož kationaktivní saponáty, jež se osvědčily pro selektivní inhibici drsných forem kvasinek, jsou všeobecně známy jako velmi účinné desinfekční prostředky, zjišťovali jsme, zda drsné formy kvasinek nejsou vůbec citlivější vůči desinfekčním prostředkům než formy hladké. Z tohoto důvodu jsme sledovali účinnost fenolu, sublimátu, merfenu a benzoanu sodného na obě formy studovaných kvasinek (*S. fragilis*, lihovarská kvasinka a 2 rasy vinařských kvasinek) a na křísotvorné kvasinky *H. anomala* a *H. Schneggi* na sladince ztužené agarem. Postupovali jsme tímto způsobem jako u povrchově aktivních látek, t. j. čárkováním na utuhlou

půdu na Petriho misce. Žádný z těchto prostředků nebyl účinnější na drsné formy. Merfen naopak byl poněkud účinnější na formy hladké. Vliv pH na účinnost těchto činidel se projevovat pouze u benzoanu, kde byl pozorován též četnými jinými autory. Účinné koncentrace těchto látek na studované kvasinky za daných zkušebních podmínek jsou udány v tabulce 6.

Tab. 6. Koncentrace některých desinfekčních prostředků, účinné na hladké a drsné formy kvasinek

Zkoušený prostředek	Koncentrace (v %), jež je účinná na					
	hladké formy		drsné formy		normální křísotvorné kvasinky	
	při pH		při pH		při pH	
	4,5	6,5	4,5	6,5	4,5	6,5
Sublimát	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Fenol	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2
Merfen*	0,025—0,050	0,025—0,05	0,05—0,10	0,10—0,25	0,25	0,5—1,0
Benzoan sodný	0,05	> 1,0	0,05	> 1,0	0,05	> 1,0

* Koncentrace jsou udány v objemových procentech Merfenu.

Použito drsných a hladkých forem kvasinek: *S. fragilis*, lihovarská kvasinka, 2 kmeny vinařských kvasinek a křísotvorných kvasinek: *H. anomala* a *H. Schneggi*. Čárkováno na sladinku s agarem obsahující příslušné desinfekční prostředky. Inkubováno při 30 °C. Při uvedených koncentracích nenastal růst ani po týdnu inkubace

Diskuse

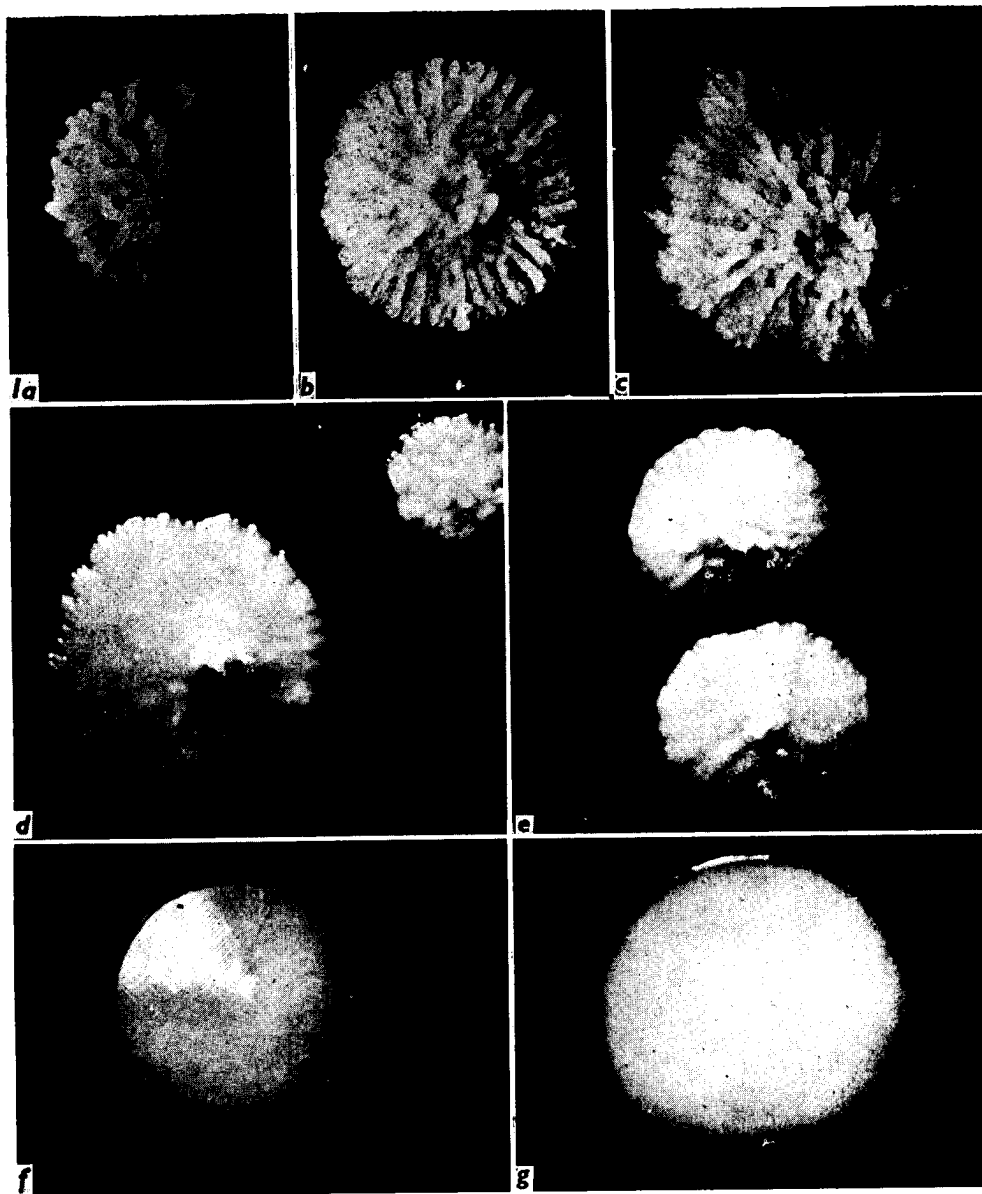
Z uvedených výsledků je patrné, že selektivní inhibiči drsných forem vedle cholátu vykazují ze zkoušených povrchově aktivních činidel jen kationaktivní saponáty, které jsou všeobecně známy jako silné desinfekční prostředky. Při tom se osvědčily lépe než cholát, neboť inhibovaly též přechodné formy. Podobně jako u cholátu sodného nedošlo u koncentrací úplně inhibujících drsné formy kvasinek ke snížení počtu kolonií hladkých forem vyrostlých vždy z jedné buňky ze suspence o známém počtu buněk, avšak rozmnožování bylo zpomaleno, což se projevilo ve velikosti vyrostlých kolonií. Je zajímavé, že další zkoušené anionaktivní látky, jež jsou slabšími desinfekčními prostředky, podobných účinků jako cholát neměly, i když byly velmi účinné ve snižování povrchového napětí. Rovněž neionogenní povrchově aktivní látky byly bez tohoto selektivního účinku na drsné formy kvasinek, takže tento účinek nelze spojovat pouze se snížením povrchového napětí. Vzhledem k tomu však, že podle našeho zjištění drsné formy kvasinek nejsou všeobecně citlivější vůči desinfekčním prostředkům a že pro selektivní účinek kationaktivních saponátů na drsné formy kvasinek je nezbytná přítomnost mastného řetězce v molekule, je zřejmé, že pro tento účinek je povrchově aktivní charakter těchto látek nezbytný. Zjištění, že k inhibiči drsných a především hladkých forem nedocházelo ani u kationaktivních látek při určité úzce vymezené hodnotě povrchového napětí, poukazuje na to, že jejich účinnost závisí jak na jejich povrchové aktivitě, tak na jejich chemické povaze. Pouze velikost snížení povrchového napětí nemůže být rozhodujícím ukazatelem účinnosti povrchově aktivních látek na mikroorganismy, což je zřejmé z toho, že povrchové napětí nějakého roztoku je jen mírou nahromadění rozpuštěné látky na rozhraní kapalina/vzduch, takže na

rozhraní kapalina/mikroorganismus budou poměry poněkud jiné. Na povrchově aktivní látky zde, jak upozorňuje Mitchell (1951), působí jednak elektrostatické síly iontů nebo polárních skupin buněčné blány, které jsou ovlivněny pH a koncentrací iontů v mediu, jednak hydrofobní složky této blány. Jedině u látek podobného chemického složení může být stejný poměr mezi nahromaděním těchto látek na obou těchto rozhraních. Hurni (1954) však ani při sledování účinku látek tak podobných jako je homologická řada kationaktivních prostředků typu Fortaseptu na bakterie nenalezl přímou závislost mezi baktericidní účinností a povrchovým napětím. V našich pokusech docházelo u zkoušených kationaktivních saponátů na sladince ztužené agarem k₁ inhibici drsných forem kvasinek v rozmezí povrchového napětí u obou zkoušených pH maximálně 2 dyn/cm, ačkoliv šlo o látky chemicky značně rozdílné. Rozhodující pro účinek je zde spíše velikost snížení povrchového napětí než jeho absolutní hodnota, což je patrné z toho, že inhibice drsných forem nastávala při vyšším pH při povrchovém napětí vyšším, než je povrchové napětí čisté sladinky o nižším pH. Ovšem z výsledků týkajících se jen několika činidel nelze dělat obecné závěry.

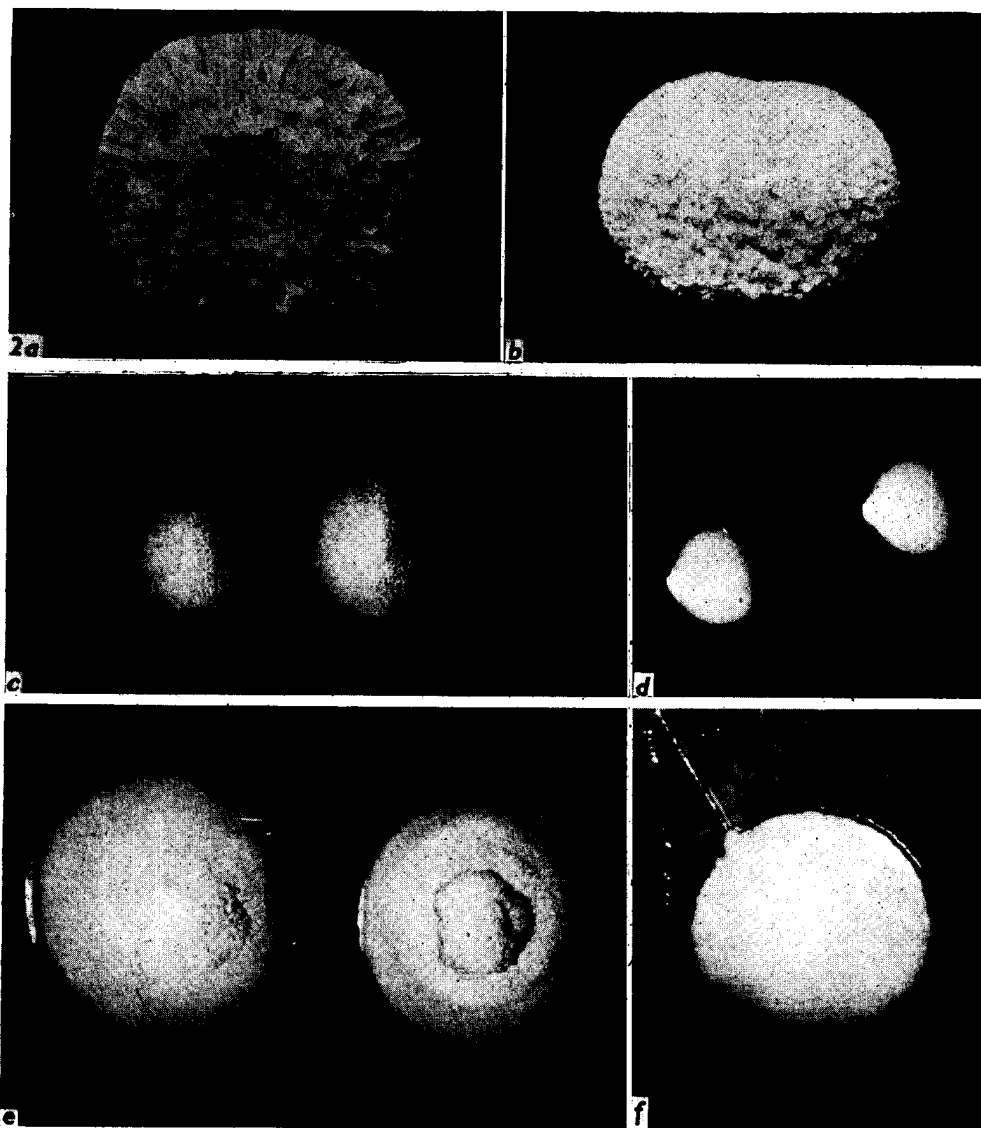
Ve svých pokusech jsme dále potvrdili nález některých jiných autorů, že kationaktivní saponáty jsou účinnější v méně kyselém prostředí, oproti tvrzení Quisnovu a Foterovu (1946), že cetylpyridiniumchlorid je téměř stejně účinný v rozmezí pH 2 až 10. Mitchell (1951) však upozorňuje, že Salton v dosud nepublikované práci zjistil vyšší účinnost kationaktivních látek u vyšších pH jen u gram-positivních mikroorganismů, zatím co u gram-negativních je prý vliv pH opačný.

Zajímavý je vliv povrchově aktivních látek na charakter kolonií. Drsné kolonie se za sníženého povrchového napětí stávaly hladkými, lesklými, vlhkými až slizovitými, při čemž se charakter kolonií měnil plynule s klesajícím povrchovým napětím. Při tom se povrchové napětí roztoku, při kterém docházelo k tvorbě lesklých, hladkých kolonií u drsných forem, značně lišilo podle toho, jakého detergenta bylo použito. U kationaktivních činidel docházelo k tvorbě lesklých kolonií jen u normálních křísotvorných kvasinek, neboť drsné formy ssedlinotvorných kvasinek byly při těchto koncentracích již úplně inhibovány. U anionaktivních činidel však k tvorbě lesklých kolonií nedocházelo ve všech případech. Je třeba ještě zjistit, zda činidla, jež nejsou schopna vytvořit lesklé kolonie z kolonií drsných, nejsou příslušnými kvasinkami štěpena nebo jinak omezována v účinku.

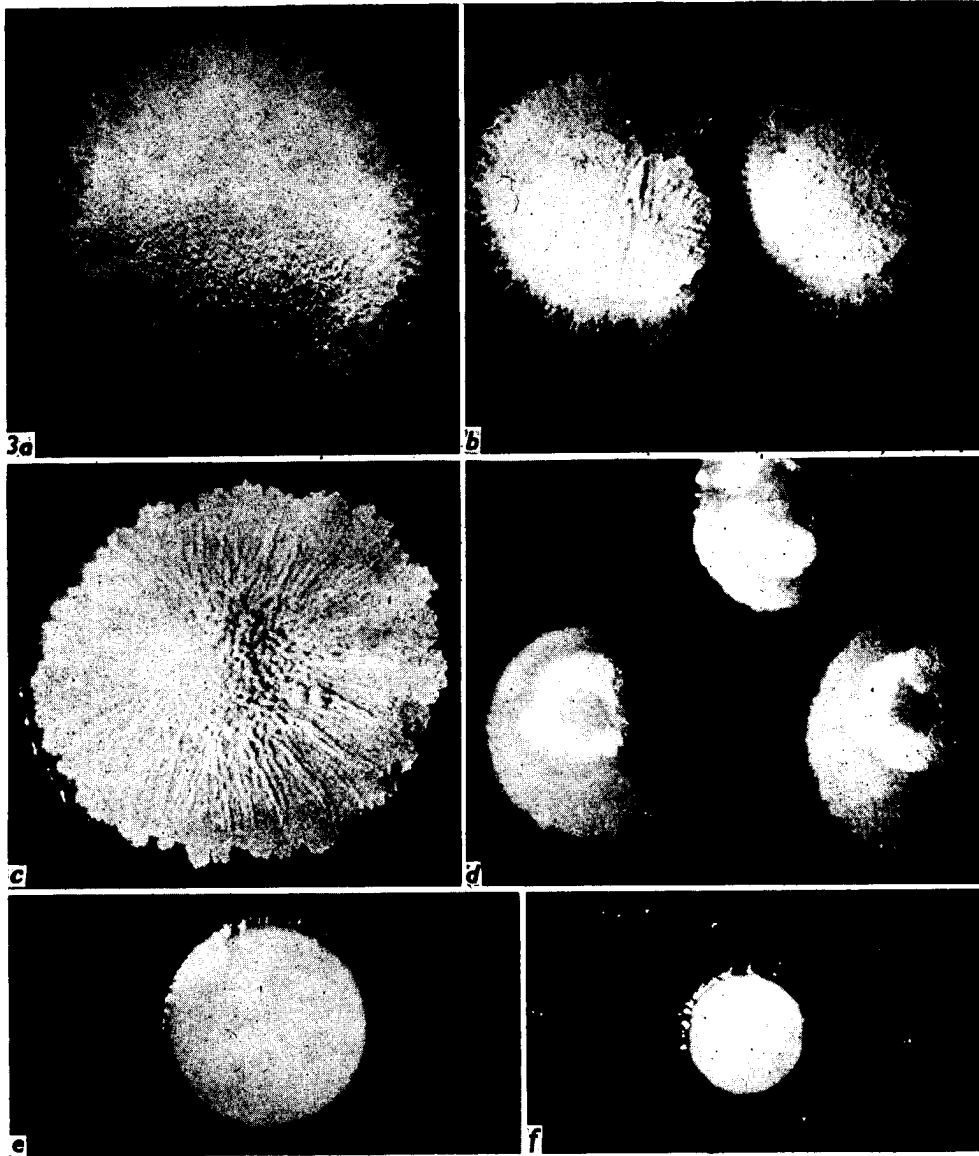
Pokud jde o vlastní příčinu vyšší citlivosti drsných forem kvasinek vůči některým povrchově aktivním látkám, nelze ji zatím jednoznačně vysvětlit. Jelikož povrchově aktivní látky jsou známy svým účinkem na buněčnou blánu a její propustnost (Hotchkiss 1946, Ito a Fujii 1955), nabízí se vysvětlení, že právě ve složení buněčné blány se drsné a hladké formy liší. Ovšem tuto domněnku nutno experimentálně potvrdit. Současně je nutno mít na paměti zjištění Kuhnovo a Bieligo (1940), že kationaktivní saponáty štěpí volnou vazbou mezi koenzymy, vitaminy a jinými aktivními složkami buňky a jejich bílkovinnými nosiči tím, že se váží na acidické skupiny těchto bílkovin. Lze se tedy domnívat, že u drsných forem jsou některé z těchto aktivních složek méně chráněny před účinkem kationaktivních saponátů, ať už je to způsobeno vlastnostmi buněčné blány, umístěním těchto složek v buňce nebo nepřítomností ochranných látek. Jelikož podle Imšeneckého (1952) vznikají drsné formy kvasinek adaptací hladkých forem na aerobní podmínky, spojenou s uchováním za nedostatku živin, bylo by zajímavé zjistit, zda lze drsné formy opakovanou kultivací na sladince s neionogenními činidly, jež nemají inhibičních účinků, avšak potlačují tvorbu blanky a tím zaručují submersní růst, převést zpět ve formy hladké.



Obr. 1. Kolonie drsných forem *S. fragilis* na sladince s agarem v přítomnosti povrchově aktivních látek. Kultivováno při 30 °C; a) 3 dny kultivace na sladince s agarem o pH 4,5, b) 3 dny kultivace na sladince s agarem o pH 6,5, c) 6 dnů kultivace na sladince s agarem o pH 6,5, d) 6 dnů kultivace v přítomnosti 0,05% Syntaponu L; pH 6,5, e) 6 dnů kultivace v přítomnosti 0,2% Tergitolu; pH 6,5, f) 6 dnů kultivace v přítomnosti 4,3% Retardonu; pH 4,5, g) 6 dnů kultivace v přítomnosti 0,2% Eryforu 0–100 %; pH 6,5. — Zvětšeno 10 ×. Foto Bezděk.



Obr. 2. Kolonie drsných forem lihovarské kvasinky na sladince s agarem v přítomnosti povrchově aktivních látek. Kultivováno 6 dnů při 30 °C; a) bez přísad, pH 6,5, b) s 0,2 % Tergitolu, pH 6,5, c) se 4,3 % Retardonu, pH 4,5, d) se 7,5% Retardonu, pH 6,5, e) s 0,2 % Eryforu 0–100 %, pH 6,5, f) s 2,0 % Eryforu 0–100 %, pH 6,5. — Zvětšeno 10 ×. Foto Bezděk.



Obr. 3. Kolonie křísotvorné kvasinky *H. anomala* na sladince s agarem po 6 dnech kultivace při 30 °C; a) bez přísad, pH 4,5, b) bez přísad; pH 6,5, c) s 10 mg% Ajatinu; pH 4,5, d) s 2,5 mg% Ajatinu; pH 6,5, e) s 0,2 % Eryforu 0–100 %; pH 4,5, f) s 0,2 % Eryforu 0–100 %; pH 6,5. Zvětšeno 10×. Foto Bezděk.

Souhrn

Kationaktivní detergenční činidla úplně inhibují rozmnožování drsných forem kvasinek ve sladince a na sladince ztužené agarem v koncentracích, kdy u hladkých forem způsobují nejvýše pouze zpomalení rozmnožování. Úplná inhibice hladkých forem nastává na sladince ztužené agarem až při 5–20násobných koncentracích těchto činidel vzhledem k inhibici drsných forem. Pro získávání původních hladkých forem ze silně dissociovaných kultur kvasinek se tato činidla osvědčila ještě lépe než cholát sodný, neboť inhibovala též přechodné (SR) formy; pH značně ovlivňuje účinnost kationaktivních saponátů na drsné i hladké formy kvasinek, což se projevuje především na půdách agarových.

Selektivní inhibiční účinek těchto látek není pouze funkcí snížení povrchového napětí, neboť neionogenní a některé anionaktivní detergenční prostředky tohoto účinku nemají.

Povrchově aktivní látky, jež nezpůsobují selektivní inhibici drsných forem kvasinek, způsobují většinou ve vyšších koncentracích přeměnu drsných kolonií v hladké, lesklé až slizovité, které se však již v první pasáži bez těchto činidel přemění v původní drsné kolonie.

Vyšší citlivost drsných forem kvasinek vůči některým povrchově aktivním látkám nelze vysvětlit vyšší citlivostí těchto forem vůči desinfekčním prostředkům vůbec. Z toho lze usuzovat na specifické působení těchto povrchově aktivních látek na drsné formy kvasinek.

Doc. Dr B. Hamplovi děkuji za zájem a připomínky při této práci. Za poskytnutí vzorků některých zahraničních výrobků povrchově aktivních látek děkuji Dr M. Vondráčkovi z Výzkumného ústavu antibiotik.

Literatura

- Damm, H.: *Grenzflächenaktive Verbindungen und Mikroorganismen*. Zbl. Bakter., II. Abt. 109 : 349, 1956.
- Glassman, H. N.: *Surface active agents and their application in bacteriology*. Bact. Revs. 12 : 105, 1948.
- Hotchkiss, R. D.: *The nature of bactericidal action of surface active agents*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 46 : 479, 1946.
- Hurni, H.: *Bactericide Wirkung und Oberflächenspannung quaternärer Ammoniumsalze*. Schweiz. Z. allg. Pathol. Bakteriolog. 17 : 194, 1954.
- Imšeneckij, A. A.: *O nakopleniji biomassy v kulturach skladčatoj formy Saccharomyces cerevisiae*. Mikrobiologija 21 : 3, 1952.
- Ito, Y., Fujii, T., Fujii, R.: *Bactericidal action of invert soap*. J. Pharm. Soc. Japan 75 : 310, 1955. Ref. C. A. 49 : 10426h.
- Komarova, L. I.: *Vlijanie četvertičnyh ammonijnyh sojedinenij na drožži pri rozličnyh uslovijach*. Mikrobiologija 22 : 566, 1953.
- Kuhn, R., Bielig, H. I.: *Über Invertseifen. I. Die Einwirkung von Invertseifen auf Eiweißstoffe*. Berichte deut. chem. Ges. 73 : 1080, 1940.
- Mitchell, P.: *Physical factors affecting growth and death. Bacterial physiology*. C. H. Werkman a P. W. Wilson, New York 1951.
- Quisno, R., Foter, M. I.: *Cetylpyridiniumchlorid. I. Germicidal properties*. J. Bact. 52 : 111, 1946.
- Shibasaki, I., Terui, G.: *Antimicrobial activity of surface-active substances*. J. Fermentation Technol. (Japan) 31 : 28, 1953, Ref. CA47, 5484d.
- Stacey, M., Webb, M.: *Antibacterial properties of the bile acids and some compounds derived from cholan acid*. Proc. Roy. Soc. (London) B 134 : 523, 1947.
- Šilhánková, L.: *Selektivní inhibice drsných forem kvasinek*. Čs. mikrobiol. 1 : 204, 1956.

Действие поверхностно-активных веществ на складчатые и гладкие формы дрожжей

Л. Шилганкова

Резюме

Катионактивные смачиватели полностью подавляют размножение складчатых форм колоний дрожжей на сусле и агаре с суслом в концентрациях, которые у гладких форм вызывают разве только замедление размножения. Полное подавление гладких форм на агаре с суслом наступает только при в 5—20 раз больших концентрациях этих реагентов (в сравнении с угнетением складчатых форм). Для получения первоначальных гладких колоний из сильно диссоциированных культур дрожжей эти реагенты подходят еще лучше, чем хлорид натрия, так как они подавляют и переходные формы (SR); pH в значительной степени влияет на действие катионактивных сапонатов на складчатые и гладкие формы дрожжей, что проявляется прежде всего на средах с агаром. Выборочное угнетающее действие этих веществ это не просто функция понижения поверхностного натяжения, так как неионогенные и некоторые анионактивные смачиватели не оказывают такого действия. Поверхностно-активные вещества, не обладающие способностью выборочного подавления складчатых форм дрожжей, в высоких концентрациях вызывают большей частью превращение складчатых колоний в гладкие, блестящие и даже слизистые, которые однако уже при первом пассаже без этих реагентов снова превращаются в первоначальные складчатые колонии. Повышенную чувствительность складчатых форм дрожжей к некоторым поверхностно-активным веществам невозможно объяснить их более высокой чувствительностью к дезинфицирующим средствам вообще. Из этого можно сделать вывод о наличии специфического действия этих поверхностно-активных веществ на складчатые формы дрожжевых колоний.

The Effect of Surface Active Agents on Rough and Smooth Forms of Yeasts

L. Šilhánková

Summary

Cation-active detergents completely inhibit the growth of rough forms of yeasts in wort and wort agar, in concentrations which only slow down the rate of growth of smooth forms.

The smooth forms are completely inhibited on wort agar by concentrations five to twenty times higher than those required for the inhibition of rough forms. These agents are more suitable for obtaining original smooth forms from strongly dissociated yeast-cultures than sodium cholate, because they also inhibit transitional (SR) forms of yeasts. The effect of cation-active detergents on rough and smooth forms of yeasts is markedly influenced by pH especially in agar media. The selective inhibitory action of these substances does not only consist in lowering surface tension, since non-ionogenic and some anion-active detergents do not possess this property. Surface active agents that do not cause selective inhibition of rough forms of yeasts usually cause the conversion of rough colonies into smooth, glittering or slimy colonies, which return, however, to the original rough colonies in the first subculture without these agents. The higher sensitivity of rough forms of yeasts to surface active agents cannot be ascribed to the higher sensitivity of these forms to disinfectants in general. These results indicate that cation-active detergents exhibit a specific effect on rough forms of yeasts.

Československá
MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 4

**Asimilace cukrů a kyselin při kontinuálním zdrojování neřaděných
sulfitových výluhů**

**IVAN MÁLEK, MIKULÁŠ BURGER, LIBUŠE HEJMOVÁ, JAN ŘIČICA, ZDENĚK FENCL
a KAREL BERAN**

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Došlo 20. 11. 56

Při vypracování teorií kontinuálních kultivací mikroorganismů byly modelové pokusy sestaveny tak, aby organický substrát byl pokud možno přeměňován přímo v buněčnou hmotu bez hromadění meziproductů (Monod 1950, Málek 1955, Herbert 1956). Podmínky kultivace (složení substrátu, pH, množství vzduchu, atd.) byly voleny tak, aby vyhovovaly růstu daného mikroorganismu. Použijeme-li ke kultivaci mikroorganismů media, které obsahuje různé vzájemně se lišící složky, jejichž asimilace je podmíněna tvorbou adaptivních enzymatických systémů, a jedovaté látky, v jejichž přítomnosti kultivace mikroorganismů je taktéž závislá na adaptivních systémech, kontinuální proces se stává složitějším. Takovou půdou jsou sulfitové výluhy, které obsahují směs cukrů (glukosa, mannososa, fruktosa, galaktosa, xylosa a arabinosa), těkavé kyseliny (octová a mravenčí) a látky brzdicí růst (jako fural, koloidy a kysličník siřičitý).

Diskontinuální zdrojování sulfitových výluhů je již značně propracováno (Fink a Lechner 1936, Lechner 1940, Fink, Lechner a Illig 1942). V provozu se také používá kontinuálních metod (Bernhauer 1950, Inskip a spol. 1951). Je však málo prací, které by studovaly základní problémy, jejichž vyřešení je nutné pro dokonalé využití metody kontinuální kultivace na tomto substrátu. Při zdrojování sulfitových výluhů používáme mikroorganismů, které jsou adaptované na jedovaté složky sulfitových výluhů. Je otázkou, do jaké míry udržuje organismus tyto adaptivní vlastnosti během dlouhodobé kontinuální kultivace a zda případně nedochází k posílení těchto adaptivních vlastností. Tyto otázky jsou s technologiického hlediska zvláště významné, chceme-li zdrojovat neřaděné sulfitové výluhy, které nejsou upraveny složitějšími, méně ekonomickými a od stávajících způsobů odlišnými metodami. V takovém případě jsou totiž jedovaté složky substrátu přítomny v systému v poměrně vysoké koncentraci. Je nebezpečí, že dojde během kultivace k postupné degeneraci kultury.

Je známo, že při rovnovážném stavu (steady state) během průtokové kultivace platí vztah, že zdrojovací rychlost (t. j. poměr objemu přítoku k celkovému objemu v systému na jednotku časovou) se rovná specifické růstové rychlosti mikroorganismu. Změnou průtokové rychlosti můžeme až do určité hranice měnit koncentraci mikroorganismů v systému. Aby nastala maximální rychlost růstu, je nutno udržovat koncentraci substrátu nad určitou hladinou. V tomto případě však může nastat takový stav, že nebude veškeré množství živin v systému asimilováno.

Pro technickou praxi je výhodná taková průtoková rychlost, aby při největší rychlosti růstu daného mikroorganismu byly vypočteny všechny asimilovatelné složky protékající půdy. To je, aby bylo dosaženo oné rychlosti průtoku, která hraničí s rychlostí, při níž již nedochází k úplné asimilaci substrátu (hraniční průtoková rychlost). Je zřejmé, že s tohoto hlediska bude pro technickou praxi výhodný ten organismus, u kterého je možno použít největší průtokové rychlosti při úplném využití asimilovatelných složek a při maximálním možném výtěžku. Při tom je zřejmé, že výtěžky za těchto podmínek nemohou překračovat maximum možných výtěžků, které je možno získat stacionární kultivací.

V této práci srovnáváme maximální rychlosti průtoku, při kterých dochází k úplné asimilaci cukrů a kyselin v sulfitových výluhách (hraniční rychlost) kvasinkami,

a to u dvou kmenů *Torulopsis utilis* a jednoho kmene *Monilia murmanica*; těchto druhů se v provozech obecně používá. Při tom se snažíme přispět také k otázce proměnlivosti adaptivních systémů, nutných pro asimilaci pentos a galaktosy a pro překonání jedovatých složek při kontinuální kultivaci mikroorganismů na neřeďných a laboratorně neupravovaných sulfitových výluzích.

Materiál a metody

Použití mikroorganismy. K pokusům jsme použili dvou sbírkových kmenů *Torulopsis utilis* (č. 4 a 5) a kmene *Monilia murmanica*, pocházejícího ze sbírky prof. Plevakové, dodaného Výzkumným ústavem kvasného průmyslu. Kmen *T. utilis* č. 4 se lišil od kmene č. 5 tím, že velikost buněk jak na pevných, tak na kapalných půdách i na sulfitových výluzích byla podstatně větší. Kmeny byly adaptovány pasážováním, střídavě na šikmých agarech a submersně, na sulfitových výluzích a na syntetické půdě obsahující jako cukerný zdroj buď xylosu nebo galaktosu. Ani jeden kmen nebyl adaptován na arabinosu a *T. utilis* kmen č. 5 nebyl adaptován na galaktosu.

Složení a úprava sulfitového výluhu. Sulfitový výluh jsme obdrželi ze závodu Jindřichovské papírny, n. p. Pocházel z várky měkké celulosy (Björkmannovo číslo 60). Byl v provozu neutralisován při teplotě 70–80 °C; v laboratoři byly po zahřátí na 90 °C přidány tyto soli (uvádíme je v konečné koncentraci): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 %; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %; KCl 0,02 %. Výluh byl za tepla dekantován, pH čiré pudy upraveno na 5,5 a poté sterilován 45 min. při tlaku 1 atm. Po sterilaci se pH změnilo na 5,1, při čemž výluh zůstal čirý. Výluh nebyl jiným způsobem laboratorně upravován, takže koncentrace kyslíčnicku siřičitého a furalu se téměř nezměnila vzhledem k původnímu obsahu. Fosfát byl přidáván při kultivaci, jak je uvedeno dále.

Použitý sulfitový výluh obsahoval 3,3 % redukujících látek, z toho 2,6 % cukrů, 0,016 % furfurolu, 0,015 % volného SO_2 , 0,057 % aldehydicky vázaného SO_2 a 0,2 % těkavých kyselin (jako kyselina octová).

Přístroj. Používali jsme kultivačního přístroje, který sestavil J. Řičica. Přístroj sestává ze tří dvoulitrových fermentačních nádob spojených za sebou, kterými substrát protéká regulovanou rychlostí. Jednotlivé fermentační nádoby obsahovaly 1 litr výluhu a tento objem byl stále udržován během pokusů. Rychlost průtoku jsme řídili kalibrovaným regulačním přístrojem, množství vzduchu vhněného pod skleněné vířivé míchadlo jsme měřili diferenciálními průtokoměry. Počet obrátek míchadla byl taktéž regulován. Pro různé obrátky a množství prohněného vzduchu bylo zjištěno množství rozpuštěného kyslíku siřičitanovou metodou. Zdrožděný substrát vytékající ze třetí fermentační nádoby byl shromažďován ve zvláštní jímácí nádobě. Fermentační nádoby byly umístěny v termostatické lázni. Před každým pokusem byl přístroj sterilován v autoklávu hodinu při přetlaku 1 atm.

Analytické metody. Redukující mohutnost jsme stanovili modifikovanou metodou Fehling-Bertrandovou (cit. Boríšek, Šála a Svatoň 1953). Obsah cukrů jsme zjišťovali z rozdílu redukční mohutnosti v původním výluhu a ve výluhu po úplné asimilaci cukrů; vyjadřujeme jej jako glukosu. Ani prodlouženou kultivaci nebylo možno dosáhnout úplného vymizení arabinosu ze substrátu. Proto veškerý cukr je zde míněn jako celkový cukr mimo arabinosu. Chromatografickou analýsou jsme zjistili, že použitý výluh obsahuje arabinosu v množství menším než 0,05 %, což představuje méně než 1,9 % ve výluhu přítomných cukrů. Vzhledem k tomuto malému obsahu nerozlišujeme v dalším veškerý cukr od veškerého cukru mimo arabinosu.

Fural jsme destilovali podle metody Tappi (cit. Boríšek a sp. 1953) a v destilátu jsme jej stanovili bromometricky podle Powela a Whittackera (cit. Jureček 1951).

Těkavé organické kyseliny byly stanoveny rovněž metodou Tappi (cit. Boríšek a sp. 1953) destilací v Markhamově přístroji. Jsou vyjádřeny jako kyselina octová.

Kyslíčnick siřičitý volný byl stanoven přímou titrací jodem. Aldehydicky vázaný kyslíčnick siřičitý jsme stanovili jodometricky po destilaci v Markhamově přístroji s kyselinou octovou (1 ml 70% kyseliny octové na 5 ml vzorku).

Sušina kvasinek byla stanovena filtrací 10 ml suspence kvasinek skleněným filtračním kelímkem G_4 . Kvasinky po promytí (jednou 0,01 N-HCl a dvakrát destilovanou vodou) byly sušeny 2 hodiny při 105 °C.

K chromatografické analýze cukrů jsme použili metody Greena a Stonea (1952). Touto metodou lze dobře oddělit tyto cukry obsažené ve výluzích: galaktosu, glukosu, mannosu a xylosu. Mannosa, arabinosa a fruktosa mají zde stejné R.F. Jelikož fruktosa je přítomna v sulfitových výluzích v poměrně malém množství a je velmi dobře asimilovatelná, nesledovali jsme kvalitativně její přítomnost ve zdrožděném substrátu a neodlišovali jsme ji od mannosy. V některých případech bylo nutno oddělovat arabinosu a zjišťovat její koncentraci. Z několika zkoušených vyvíjecích směsí se nám podařilo arabinosu dostatečně oddělit od mannosy pětinasobným vyvíjením chromatogramu ve směsi isobutanol, ledová kyselina octová, voda (v poměru 4 : 1 : 1). Množství arabinosu jsme zjistili porovnáním skvrn vzorků se skvrnami známého množství arabinosu.

Kyslík přiváděný do fermentačních nádob jsme stanovili siričitanovou metodou (Cooper, Fernstrom a Miller 1944); pH bylo měřeno elektronkovým pH metrem.

Pracovní postup. Inokulum pro kultivaci jsme připravili submersní kultivací kvasinek v sulfítoých výlužích na třepacím stroji. Jednotlivé fermentační nádoby byly na začátku pokusu naplněny sulfítoým výluhem tak, aby po přidání inokula byl objem kapaliny v každé nádobě 1 litr. Pak probíhala stacionární kultivace popsaná ve výsledcích u jednotlivých pokusů. Po skončení stacionární kultivace byly jednotlivé fermentační nádoby navzájem spojeny a zahájena průtoková kultivace. Čerstvý substrát byl sterilně přiváděn do první fermentační nádoby, odtékající suspence kvasinek z třetí nádoby byla shromažďována v jímací nádobě. Během celé kultivace byla teplota udržována při 30 °C a pH amoniakem v rozmezí 4,5–5,5. Odpěnováno bylo několika kapkami sojového oleje. Každá kultivační nádoba byla vzdušněna litrem vzduchu na minutu při počtu obrátek michadla 500–600/min. Za těchto podmínek rozpustnost kyslíku odpovídala (měřeno siričitanovou metodou) 120 mM/hod./l. K pění došlo nejvíce na počátku kultivaci, později došlo k ustálení, zvláště při kultivaci *Mon. murmanica*, kdy nebylo třeba odpěnovat i celých 24 hodin.

Během celé kultivace jsme přikapávali do systému sterilní 25% roztok KH_2PO_4 v takovém množství (podle rychlosti průtoku), aby jeho koncentrace byla 0,2 %.

Ekonomický koeficient (výtěžek) je vztažen na veškerý přítomný cukr a je uveden v těch fázích kultivace, kdy se ustaluje rovnováha v systému a kdy se prakticky shodují sušiny kvasinek na jednotku objemu substrátu v jímací nádobě a ve třetí, případně někdy i ve druhé fermentační nádobě.

Výsledky

Kultivace kmene *Monilia murmanica*

Stacionární kultivace byla zahájena při sušině 3 mg/ml a trvala 11 hodin, kdy bylo dosaženo sušiny 7 mg/ml.

Tab. 1. Průběh asimilace cukrů a těkavých kyselin u kmene *Monilia murmanica*

Nádoba	Hodiny kultivace											
	0	5	9	15	20	34	39	44	52	58	67	80
	Přítok substrátu v ml/hod.											
	100				120				150			
Cukr mg v 1 ml												
1	1,0	—	2,0	3,0	6,2	11,5	11,8	12,2	—	14,1	15,8	15,3
2	—	—	0,7	0	0	0	1,0	1,3	—	3,8	3,6	5,6
3	—	1,0	0,7	0	0	0	0	0	—	0	0	1,7
Těkavé kyseliny mg v 1 ml												
1	—	—	2,1	2,2	—	—	—	2,2	—	—	—	2,2
2	—	—	—	0,2	—	0,3	—	1,1	—	2,2	—	2,2
3	—	—	0,3	0,2	—	—	—	0,3	—	—	—	1,5
Ekonomický koeficient												
2				50,2	49,5							
3				48,0	48,4	46,8	44,1	46,8	45,0			
J					50,2	48,4		46,4	42,9			

1, 2, 3 — první, druhá, třetí fermentační nádoba. J — jímací nádoba.

Výsledky průtokové kultivace jsou shrnuty na obrázcích 1, 4a, 4b a v tabulce 1. Prvních 15 hodin kultivace byl průtok 100 ml/hod. Během této doby dochází k poklesu sušiny v první fermentační nádobě, v druhé a ve třetí však sušina stoupá

a v 15. hodině je dosaženo v druhé fermentační nádobě ekonomického koeficientu 50,2, při čemž v třetí nádobě mírně klesá na 48. Koncentrace cukrů v systému taktéž klesá, při čemž v 15. hodině v první fermentační nádobě je přítomno pouze 11,6 % původního množství cukrů, která, jak chromatogram ukazuje, odpovídají mannose, arabinose a xylose. Ve druhé a ve třetí fermentační nádobě je v této hodině přítomna pouze arabinosa, jejíž množství je, jak již bylo řečeno, v našem případě zanedbatelně malé. V této hodině je množství kyselin v první fermentační nádobě poněkud vyšší než původní množství v substrátu, což je možno vysvětlit tvorbou těkavých kyselin během kultivace; o tom také svědčí skutečnost, že při kultivaci tohoto kmene bylo nutno přidávat více amoniaku k udržení potřebného pH než při následujících kultivacích. V druhé fermentační nádobě však dochází k téměř úplné asimilaci přítomných kyselin (zbývajících 10 % z původního množství může být kyselina mravenčí). V třetí fermentační nádobě nedochází již k dalšímu úbytku kyselin.

V 15. hodině byl zvýšen průtok na 120 ml/hod.; při tomto průtoku dochází k ustálení ve druhé kultivační nádobě, o čemž svědčí průběh sušiny a zejména také redukující mohutnost i chromatografie ve vzorcích půdy (obr. 4a). Již v druhé fermentační nádobě není přítomen žádný cukr. Sušina i zde pak poněkud klesá, ve třetí fermentační nádobě pravděpodobně autolysou nebo spotřebou endogenního substrátu, pro což mluví skutečnost, že zde větrání probíhá za nepřítomnosti asimilovatelných látek.

Při dalším zvyšování průtoku na 150 ml/hod. začíná znatelné vyplavování kvasinek v druhé fermentační nádobě a pozvolná i ve třetí. Je vidět stálý pokles sušiny nejdříve v druhé nádobě, později ve třetí. Tomu odpovídá také zvyšování množství cukrů v jednotlivých nádobách, takže v 80. hodině jsou již v druhé fermentační nádobě přítomny mimo glukosu všechny cukry obsažené v původním substrátu, i když v menším množství, a ve třetí nádobě je přítomna vedle arabinosy také mannosy a xylosy. V této hodině je těkavých kyselin ve třetí fermentační nádobě přítomno rovněž poměrně značné množství.

Arabinosa, na kterou, jak již bylo řečeno, nebyla provedena předběžná adaptace, není odstraněna ze substrátu ani v těch případech, kdy již v druhé nádobě je přítomna pouze jako jediný cukr, přechází do třetí nádoby a zůstává i tam nedotčena.

Mikroskopický i makroskopický obraz ukazoval během celé kultivace aglutinaci. Jinak mikroskopický obraz zůstával bez pozorovatelných rozdílů během celé kultivace.

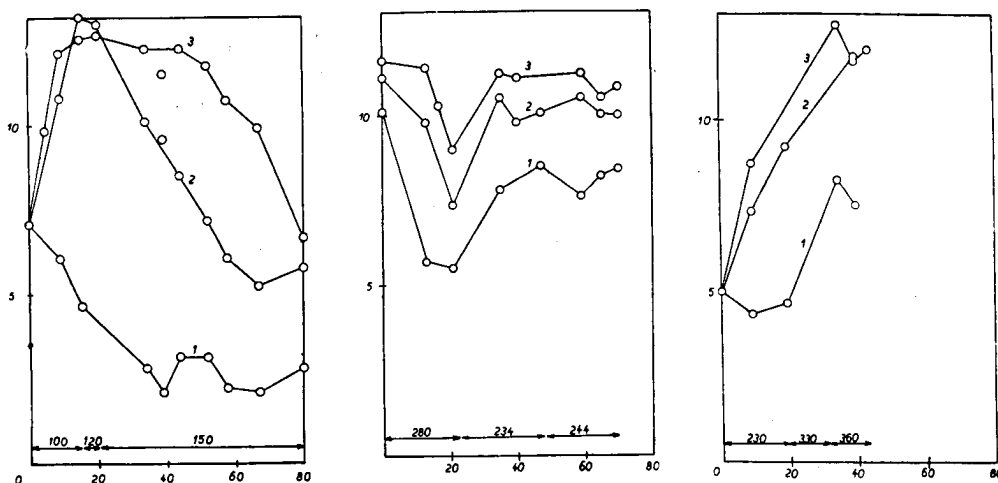
Výsledky ukazují, že hraniční průtoková rychlost, jak byla definována v úvodu, leží přibližně při 120 ml/hod. při systému dvou nádob (celkový objem 2 litrů). Při této průtokové rychlosti dochází k úplné asimilaci substrátu v druhé fermentační nádobě.

Kultivace *Torulopsis utilis* kmen č. 5

Stacionární kultivace byla zahájena při sušině 3,8 mg/ml a trvala 10 hodin, kdy bylo dosaženo v jednotlivých fermentačních nádobách od 10,1 do 11,6 mg/ml sušiny.

Průběh průtokové kultivace je shrnut na obrázcích 2, 5a, 5b a v tabulce 2. Prvních 21 hodin byl průtok 280 ml/hod. Při tom je zřetelný úbytek sušiny ve všech fermentačních nádobách a nedochází ani k úplné asimilaci cukrů. Ve třetí nádobě je v 21. hodině přítomno ještě přes 25 % celkového množství cukrů (tab. 2). Chromatografická analýza nám ukázala, že jsou zde přítomny mimo glukosu všechny ostatní cukerné složky sulfitového výluhu (obr. 5a). Je tedy zřejmé, že při této rychlosti průtoku se buňky vyplavují. Proto jsme v této hodině snížili průtok

a do 47. hodiny pokračovali při 234 ml/hod. Při tomto průtoku dochází k ustálení, při čemž ve třetí nádobě dosahuje ekonomický koeficient hodnoty 43 (tab. 2). Ale ani zde nebyly cukry zcela asimilovány, protože v třetí nádobě je přítomno ještě přes 11 % z jejich původního množství. Při tom je důležité, že v první nádobě je



Obr. 1. *Monilia murmanica*. — Obr. 2. *Torulopsis utilis* kmen č. 5. — Obr. 3. *Torulopsis utilis*, kmen č. 4. Sušina v průběhu kultivace mikroorganismů. Osa x_1 : rychlost průtoku, osa x_2 : hodiny kultivace, osa y : mg sušiny v ml substrátu. Křivka 1, 2, 3 — první, druhá, třetí fermentační nádoba.

Tab. 2. Průběh asimilace cukrů a těkavých kyselin u kmene *Torulopsis utilis* č. 5

Nádoba	Hodiny kultivace									
	0	13	17	21	35	40	47	59	65	70
	Přítok substrátu v ml/hod.									
	280			234				244		
Cukr mg v 1 ml										
1	6,6	8,9	—	13,1	9,2	—	7,2	6,6	6,9	6,6
2	5,9	7,2	—	8,5	5,6	6,3	6,3	4,6	4,6	4,8
3	5,3	4,9	5,3	6,6	4,6	2,6	3,0	2,6	2,6	2,2
Těkavé kyseliny mg v 1 ml										
1	0,2	—	—	—	—	—	—	0,2	—	1,3
2	0,4	—	—	—	—	—	—	0,3	—	0,2
3	0,5	—	—	0,8	0,3	—	—	0,2	—	0,2
Ekonomický koeficient										
2					40,8	37,9		40,5	38,7	38,7
3					43,3	43,0		43,3	40,5	41,8
J							42,3	41,9		40,7

1, 2, 3 — první, druhá, třetí fermentační nádoba. J — jímací nádoba.

již poměrně nízká koncentrace cukrů (28 % původního množství), v druhé nádobě pouze 24 % původního množství. Chromatografická analýza nám ukázala, že z druhé nádoby přechází do třetí nádoby vedle arabinosy i xylosa a galaktosa, v třetí fermentační nádobě pak xylosy podstatně ubývá. Koncentrace galaktosy se však nemění. To dokazuje, že za daných experimentálních podmínek projevuje tento kmen mnohem menší schopnost asimilovat xylosu a galaktosu vůbec, anebo téměř vůbec neasimiluje. Je zde nutno zdůraznit, že tento kmen nebyl předběžně adaptován na galaktosu a při jednorázových kultivacích také xylosu asimiloval ve srovnání s ostatními námi studovanými kmeny podstatně pomaleji.

Těkavé kyseliny jsou asimilovány ve stejné míře jako při předchozí kultivaci. V 70. hodině zůstává v první fermentační nádobě 65 % původně přítomných kyselin, v druhé a v třetí nádobě 10 % původního množství.

I u tohoto kmene jsme zjistili aglutinaci, důležité však je, že během kultivace tato aglutinace mizí a v 55. hodině již kultura nejeví znaky aglutinace. Avšak ani za těchto podmínek se nelepší výtěžky.

Hraniční průtoková rychlost, při níž dochází prakticky k úplné asimilaci těch cukrů, na něž byl kmen předem adaptován (tedy vyjma arabinosy a galaktosy), je 244 až 280 ml/hod. při systému tří nádob (celkový objem 3 litry).

Kultivace *Torulopsis utilis* kmen č. 4

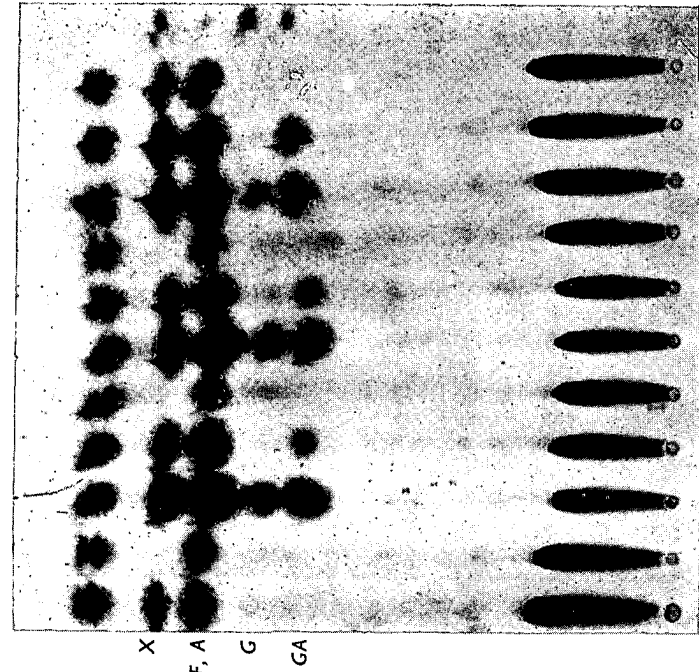
Stacionární kultivace probíhala obdobně jako v předešlých kultivacích. Byla zahájena při sušině 0,6 mg/ml a trvala 11 hodin, kdy bylo dosaženo sušiny 5 mg/ml.

Tab. 3. Průběh asimilace cukrů a těkavých kyselin u kmene *Torulopsis utilis* č. 4

Nádoba	Hodiny kultivace				
	9	19	34	39	43
	Přítok substrátu v ml/hod.				
	230	330	360		
Cukr mg v 1 ml					
1	3,4	5,3	3,0	4,3	—
2	1,3	0	0	1,3	—
3	0	0	0	0	0
Těkavé kyseliny mg v 1 ml					
1	—	—	0,4	—	—
2	—	—	0,2	0,4	—
3	—	—	0,2	—	0,2
Ekonomický koeficient					
2			43,5	45,8	
3			49,2	45,3	46,5
J				42,3	42,7

1, 2, 3 — první, druhá, třetí fermentační nádoba. J — jímací nádoba.

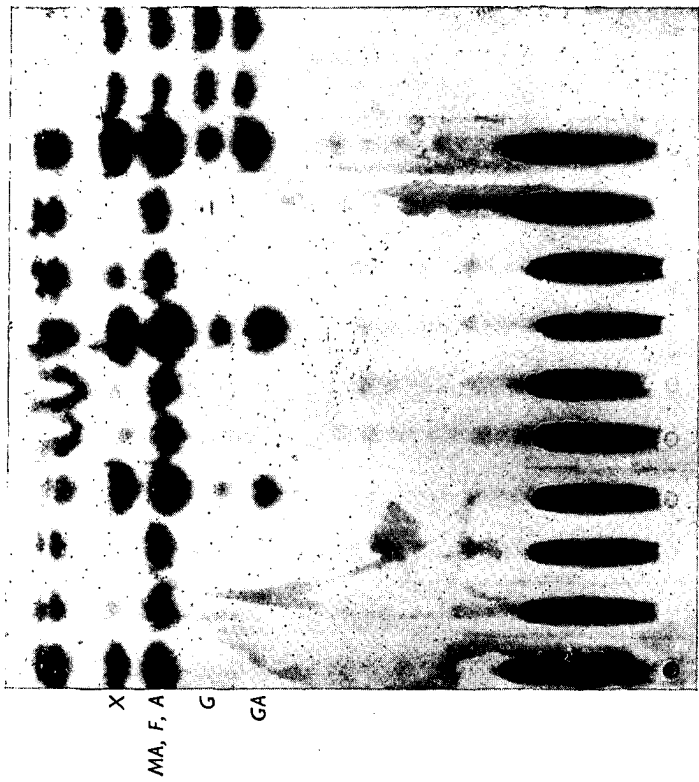
Obrázek 3, 6a, 6b a tabulka 3 ukazují shrnuté výsledky z průtokové kultivace. Po zahájení průtoku při přítoku 230 ml/hod. dochází v první fermentační nádobě



F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 ST

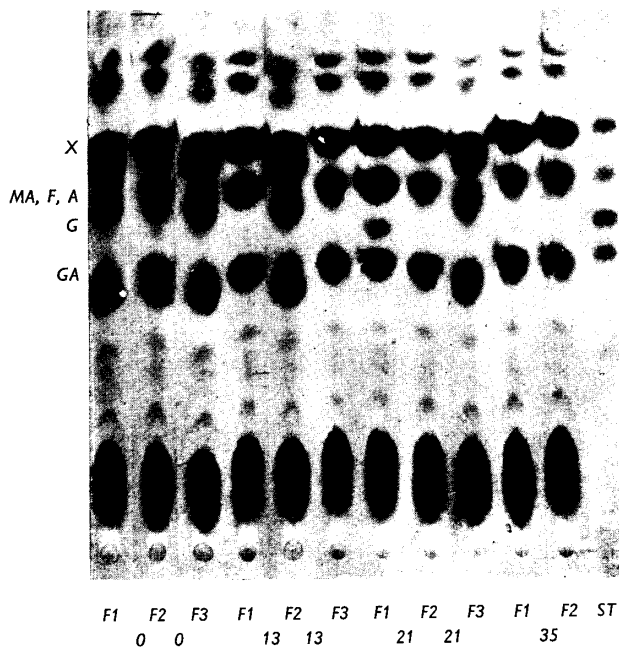
Obr. 4b.

Průběh asimilace cukrů *Monilia murmanica*.
 Osa x: hodiny kultivace, F₁–F₃: první, druhá, třetí fermentační nádoba. ST – standardní roztok galaktosy, glukosy, mannosy a xylosy. X – xyloza, A – arabinosa, F – fruktosa, MA – mannoza, G – glukosa, GA – galaktosa.

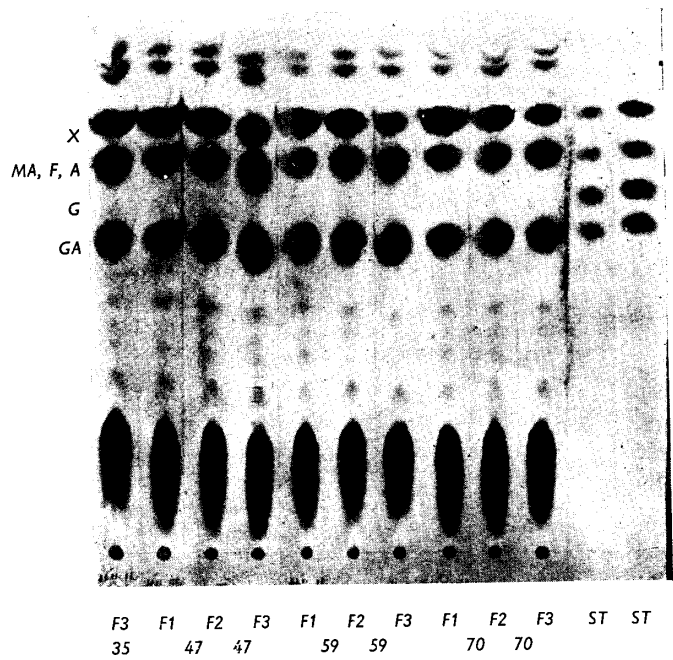


F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 F1 F2 F3 ST

Obr. 4a.



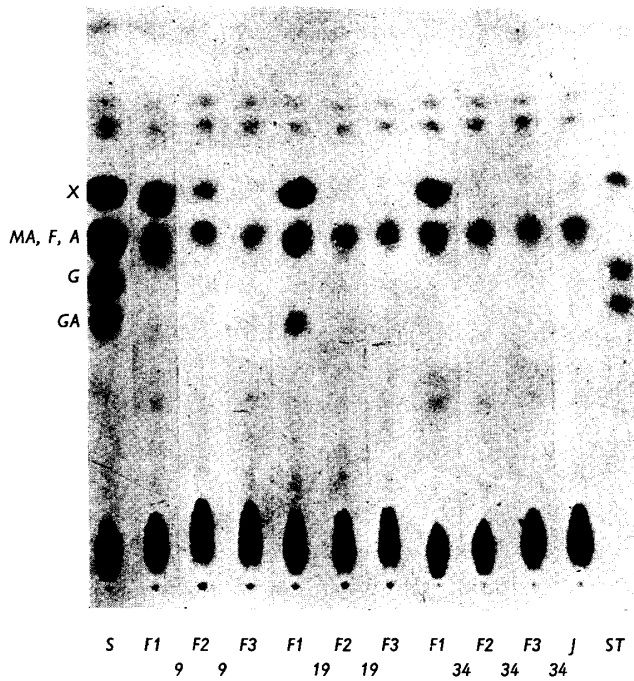
Obr. 5a.



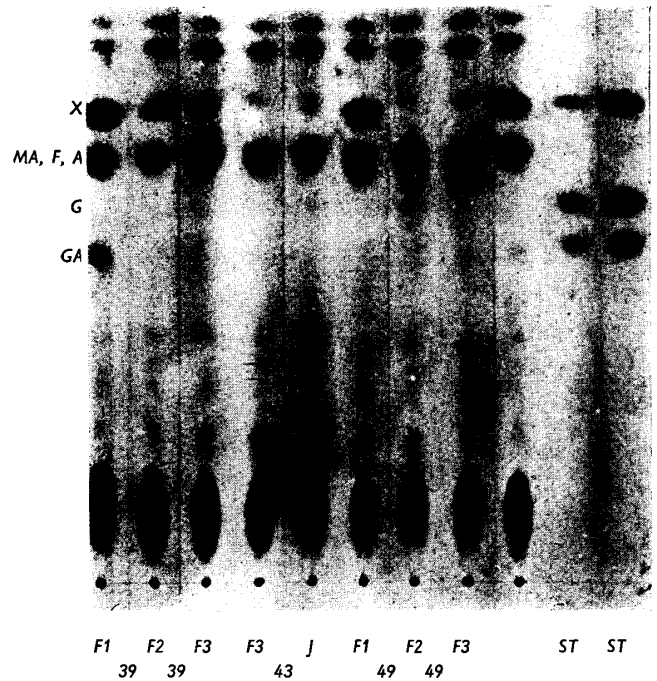
Obr. 5b.

Průběh asimilace cukrů *Torulopsis utilis*, kmen č. 5.

Osa x: hodiny kultivace, F₁-F₂-F₃: první, druhá, třetí fermentační nádoba. ST - standardní roztok galaktosy, glukosy, mannosy a xylosy. X - xylosa, A - arabinosa, F - fruktosa, MA - mannosy, G - glukosa, GA - galaktosa.



Obr. 6a.



Obr. 6b.

Průběh asimilace cukrů *Torulopsis utilis*, kmen č. 4.

Osa x: hodiny kultivace, F₁–F₂–F₃: první, druhá, třetí fermentační nádoba, J: jímací nádoba. ST – standardní roztok galaktosy, glukosy a xylosy. X – xylosa, A – arabinosa, F – fruktosa, MA – mannosy, G – glukosa, GA – galaktosa, S – vzorek sulfitových výluhů.

k poklesu sušiny, v druhé a v třetí nádobě však sušiny přibývá (tab. 3). Po 9 hodinách kultivace je přítomno v první nádobě z celkového množství cukrů pouze 13,2 %, v druhé a v třetí nádobě množství cukrů klesá buď téměř nebo úplně k nule. Chromatogram ukazuje, že v první nádobě zbývá xylosa a arabinosa (obr. 6a).

Protože ve druhé a ve třetí nádobě již mimo arabinosu není přítomen prakticky žádný cukr (v druhé nádobě je přítomna pouze stopa xylosy, která do 19. hodiny mizí úplně), zvýšili jsme průtok na 330 ml/hod. (obr. 6a).

V 34. hodině kultivace stoupá sušina ve všech nádobách, při čemž ve třetí nádobě dosahuje hodnoty 12,7 mg/ml s ekonomickým koeficientem 49,2. Dalším zvyšováním přítoku se sušina ustaluje, při čemž sušina ve třetí nádobě se již prakticky neliší od sušiny v druhé nádobě. Jak obrázek (chromatogramy) ukazuje, i po zvýšení přítoku na 330 a na 360 ml/hod. není mimo arabinosu v druhé a ve třetí nádobě již žádný cukr a v první nádobě je vedle arabinosy pouze xylosa, vyjma 39. hodiny, kdy je ještě přítomna také stopa galaktosy (obr. 6b).

Těkavé kyseliny jsou taktéž asimilovány a v 34. a v dalších hodinách kultivace je přítomno v druhé nebo ve třetí nádobě pouze 10 % z celkového množství těkavých kyselin. Toto množství může odpovídat mravenčí kyselině.

Mikroskopický obraz kultury v průběhu kultivace ukazoval, že velikost buněk se neměnila, během celé kultivace však byla aglutinace, která se projevila také makroskopicky.

Výsledky ukazují, že hraniční průtoková rychlost je zde nad 360 ml/hod. při systému dvou nádob (celkový objem 2 litry).

Diskuse

Srovnání hraničních průtokových rychlostí při zdrojování sulfitových výluhů různými kmeny

Hraniční průtokovou rychlost a tomu odpovídající růstovou rychlost považujeme za hlavní kritérium pro hodnocení určitého kmene s hlediska jeho vhodnosti pro kontinuální zdrojování sulfitových výluhů. To však platí jen za podmínek, kdy výtěžek (ekonomický koeficient) dosahuje v hraniční průtokové rychlosti ekonomicky výhodné hladiny. Naše pokusy dokazují, že kmeny jak *T. utilis* tak i *Mon. murmanica* se mezi sebou velmi liší v hraničních průtokových rychlostech. Průtoková rychlost *T. utilis* kmene č. 4 byla nejméně třikrát větší než *Mon. murmanica*. Při tom je důležité, že v hraniční průtokové rychlosti dochází u obou kmenů k asimilaci všech cukrů (vyjma arabinosy) a těkavých organických kyselin. Ale i uvnitř jednoho druhu (*T. utilis*) nalézáme u dvou odlišných kmenů zcela rozdílné hraniční průtokové rychlosti. Příčina rozdílu zde tkví především v odlišné schopnosti asimilovat některé cukry, jejichž využitkování je podmíněno přítomností adaptivních enzymatických systémů.

Z hodnoty hraniční průtokové rychlosti je možno také vyčíslit dobu potřebnou k úplné výměně obsahu fermentačních nádob v podmínkách, při nichž dochází k využití všech asimilovatelných složek substrátů. Jelikož k úplné asimilaci substrátů (vyjma arabinosy) u *T. utilis*, kmen č. 4, docházelo při průtokové rychlosti 360 ml/hod., při čemž objem systému, ve kterém dochází k úplnému využití substrátu, odpovídá 2000 ml (v systému dvou fermentačních nádob), úplná výměna nádob nastává za těchto podmínek po $5\frac{1}{2}$ hod. Při tom dosahujeme v průměru výtěžků 46,7 % na veškerý cukr. U *Mon. murmanica* je doba potřebná k úplné výměně nádob za uvedených podmínek třikrát větší. Je pravděpodobné, že vhodnou úpravou substrátu v mezích ekonomických možností a dalším výběrem kmenů by bylo možno i uvedenou dobu $5\frac{1}{2}$ hodiny snížit.

Naskýtá se otázka, zda by nebylo možno zjišťovat hraniční průtokovou rychlost na základě růstových rychlostí získaných v stacionárních podmínkách (jednorázovou kultivací). Jsme toho názoru a některé naše výsledky také dokazují, že by to možné nebylo. Je totiž známo, že při stacionární kultivaci kvasinek na tak složitém substrátu je růstová křivka charakteristická t. zv. polyauxií, při čemž délky prodlev při asimilaci jednotlivých složek substrátu mohou být rozlišné v závislosti na mnoha faktorech. Z našich pokusů se zdá, že za podmínek průtokové kultivace, kdy je substrát limitován, budou prodlevy kratší, případně úplně vymizí. Bude však nutno shromáždit další experimentální materiál k důkazu tohoto zjevu. Další důvody, které znemožňují použití hodnot růstových rychlostí získaných ve stacionárních podmínkách, tkví v proměnlivosti adaptivních systémů během průtokové kultivace.

Proměnlivost adaptivních systémů během průtokové kultivace

Při kultivaci mikroorganismů na sulfitových výluzích záleží hladký průběh procesu na adaptivních systémech, které můžeme rozdělit zhruba do dvou celků. V jednom z těchto celků jsou zahrnuty enzymatické systémy, které umožňují asimilaci některých složek substrátu (jako na př. galaktosy, xylosy, arabinosy, kyseliny octové), druhý celek obsahuje adaptivní systémy, které umožňují růst a metabolismus mikroorganismů za přítomnosti jedovatých složek substrátu (jako na př. kysličníku siřičitého, furalu, huminových látek, atd.).

Ve svých pokusných podmínkách jsme nenalezli kvalitativní změny v adaptivních systémech katalysujících asimilaci cukrů. Ani jeden z mikroorganismů, kterých jsme používali, nebyl adaptován na asimilaci arabinosy, a také ani v jednom případě nebyl tento cukr spotřebován. Přitom množství arabinosy zůstalo prakticky stejné i v třetí fermentační nádobě jako v druhé, a to i v případech, kdy byla přítomna jako jediný cukr pro asimilaci. Arabinosa je však velmi těžko stravitelný cukr pro kvasinky. Tak na příklad Lechner (1940) zjistil, že i u adaptovaných kvasinek byla arabinosa asimilována v malé míře. Proto nevyužití arabinosy není dostatečným důkazem o tom, že během průtokové kultivace nemohou vznikat nové adaptivní systémy pro využití některého cukru. Mnohem přesvědčivějším důkazem toho, že za našich experimentálních podmínek mikroorganismus nezískal nové adaptivní systémy pro asimilaci cukrů, jsou fakta zjištěná u *T. utilis*, kmen č. 5. Tento kmen nebyl adaptován na galaktosu a během kultivace zůstávala koncentrace tohoto cukru prakticky nezměněna v celém kultivačním systému.

Jinak vypadá obraz pokud se týče adaptivních systémů nutných pro metabolismus kvasinek pro překonávání jedovatých složek substrátu. Skutečnost, že u *T. utilis*, kmen č. 5, během kultivace v průtoku po určité době zmizela aglutinace, dokazuje, že zde dochází k zesílení adaptivních vlastností vůči jedovatým složkám v substrátu. Dokladem je i další úkaz, který jsme v experimentální části neuvedli: při kultivaci několika kmenů kvasinek na substrátu z předhydrolyzátu z listnáčů, který obsahoval ještě větší koncentraci jedů (zejména furalu) než v této práci používaný sulfitový výluh, rostly hned v prvním převodu jen ty kmeny, které jsme očkovali ze zde uvedených průtokových systémů. Při tom nedošlo k nárůstu na uvedeném substrátu ani u těchto kmenů, byly-li očkovány před průtokovou kultivací zde popsanou. Tento jev si také vysvětlujeme tím, že během průtokové kultivace na sulfitových výluzích došlo k dalšímu návyku organismu na jedovaté složky substrátu. Že průtoková metoda je zvlášť výhodná pro adaptaci na jedovaté složky, svědčí i práce Verbiny (1955).

Některé otázky využití sulfitových výluhů pro kvasný průmysl

Jsme si vědomi, že náš postup nelze přímo aplikovat v provozních podmínkách. Domníváme se však, že v určitém směru mohou naše výsledky přispět v otázce ekonomického využití organického substrátu sulfitových výluhů v kvasném průmyslu. Úplné využití asimilovatelného substrátu sulfitových výluhů ze dřev jehličnatých stromů se v praxi děje dvojím odlišným způsobem: buď přímým zdrojováním výluhů nebo dvěma následujícími procesy, při čemž v prvním jsou hexosy (galaktosa, glukosa, mannosy, fruktosa) zkvašovány na alkohol a výpalky obsahující pentosy (xylosa, arabinosa) a těkavé kyseliny jsou zdrojovány. Volba způsobu se řídí převážně třemi kritérii: národohospodářskou potřebou produktů, ekonomii procesů a nutností aspoň částečně zlepšit B. S. K. odpadu. Abychom si mohli udělat úplný obraz o ekonomii jednotlivých postupů, je nutno propracovat do všech podrobností i fakta, která jsme zjistili v této práci. Je zřejmé, že některé naše nálezy (zejména o proměnlivosti adaptivních systémů) jsou aplikovatelné nejen pro zdrojování sulfitových výluhů, nýbrž i sulfitových výpalků. Pro studium těchto základních otázek však sulfitové výluhy vyhovují více než výpalky, zejména proto, že představují složitější systém.

Souhrn

Byly studovány hraniční průtokové rychlosti u dvou kmenů *Torulopsis utilis* a jednoho kmene *Monilia murmanica* při kontinuálním zdrojování neředěných sulfitových výluhů, u nichž obsah kyslíčnicku siřičitého a furalu nebyl v laboratorních podmínkách redukován. U *Torulopsis utilis*, kmen č. 4, který využívá stejně jako *Monilia murmanica* všechny cukry vyjma arabinosy ze sulfitových výluhů, byla hraniční průtoková rychlost nejméně třikrát větší než u *Monilia murmanica*.

Během průtokové kultivace na sulfitových výluzích docházelo k adaptaci mikroorganismů vůči poměrně vysokému obsahu jedovatých složek substrátu. Za uvedených podmínek jsme však nezjistili adaptaci na využití těch cukrů, na které mikroorganismy nebyly předem adaptovány.

Děkujeme za technickou spolupráci E. Masnerové a V. Klicperové.

Literatura

- Bernhauer, K.: *Fortschritte der mikrobiologischen Chemie in Wissenschaft und Technik. Ergebnisse der Enzymforschung* 11 : 151, 1950.
- Borišek, R., Šála, J., Svatoň, M.: *Sulfitové výluhy a jejich zužitkování*. Praha 1953.
- Cooper, C. M., Fernstrom, G. A., Miller, S. A.: *Performance of agitated gas-liquid conductors*. Ind. Eng. Chem. 36 : 504, 1944.
- Fink, H., Lechner, R.: *Herstellung von Futterhefe aus Sulfitablaugen*. Angew. Chem. 49 : 775, 1936.
- Fink, H., Lechner, R., Illig, R.: *Über technische Versuche zur Erzeugung von Futterhefe aus Nadelholz und Laubholz-Sulfitablaugen. Vorratspflege Lebensmittelforsch.* 5 : 100, 1942.
- Green, S. R., Stone, J.: *Fermentability of wort trisaccharide, a factor in variable attenuations*. Wallerstein Lab. Comm. 15, 51 : 347, 1952.
- Herbert, D., Elsworth, R., Telling, R. C.: *The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study*. J. Gen. Microbiology 14 : 601, 1956.
- Inskeep, G. C., Wiley, A. J., Holdeby, J. M., Hughes, L. P.: *Food yeast from sulfite liquor*. Ind. Eng. Chem. 43 : 1702, 1951.
- Jureček, M.: *Organická analýza*. Praha 1951.
- Lechner, R.: *Über die Ausnutzung der Pentosen bei der biologischen Eiweißsynthese. VI. Züchtung von Torula utilis in Arabinose, Rhamnose und Glukuronsäure*. Biochem. Z. 306 : 218, 1940.
- Lechner, R.: *Über die Ausnutzung von Pentosen*. Angew. Chem. 53 : 163, 1940.
- Málek, I.: *O množení a pěstování mikroorganismů, zvláště bakterií*. Praha 1955.
- Monod, J.: *La technique de culture continue, théorie et applications*. Ann. Inst. Pasteur 79 : 390, 1950.
- Verbina, N. M.: *Priučeníje drožžej k antiseptikam različnými metodami*. Trudy Inst. Mikrobiol. 4 : 54, 1955.

Ассимиляция сахаров и кислот при непрерывном производстве дрожжей
на неразведенных сульфитных щелоках

И. Малек, М. Бургер, Л. Геймова, Я. Ржищица, З. Фенцль и К. Беран

Р е з ю м е

Изучались предельные скорости потока у 2 штаммов *Torulopsis utilis* и у 1 штамма *Monilia murmanica* при непрерывном производстве дрожжей на неразведенных сульфитных щелоках, в которых их содержание сернистого ангидрида и фураля в лабораторных условиях не было понижено. У *Torulopsis utilis*, штамма № 4, который использует — как и *Monilia murmanica* — из сульфитных щелоков все сахара, кроме арабинозы, предельная скорость потока была минимум в 3 раза больше, чем у *Monilia murmanica*. В течение проточной культивации на сульфитных щелоках происходила адаптация микроорганизмов к сравнительно высокому содержанию ядовитых слагающих частей субстрата. В указанных условиях опыта мы не наблюдали адаптации микроорганизмов к использованию тех сахаров, к которым они предварительно не приучались.

Assimilation of Sugars and Acids during the Continuous Fermentation
of Undiluted Sulphite Waste Liquors

I. Málek, M. Burger, L. Hejmová, J. Řiřica, Z. Fencl and K. Beran

S u m m a r y

A study was made of limit rates of flow in two strains of *Torulopsis utilis* and one strain of *Monilia murmanica* during continuous fermentation of undiluted sulphite waste liquors in which the sulphur dioxide and furfural content was not reduced under laboratory conditions. In strain 4 of *Torulopsis utilis*, which utilizes all the sugars in sulphite liquors, with the exception of arabinose, in the same way as *Monilia murmanica*, the limit rate of flow was at least three times as high as with *Monilia murmanica*. In the course of continuous cultivation on sulphite liquors, the micro-organisms became adapted to a relatively high concentration of toxic substances in the substrate. Under the given conditions, however, no adaptation was found to utilization of sugars to which the micro-organisms had not previously been adapted.

Československá
M I K R O B I O L O G I E
ročník 2. (1957) — č. 4

Selekčné práce na váhove diferencovaných konídiách huby
Aspergillus terreus Thom. I.

Samovoľná nerovnocennosť spór čistej kultúry

JÁN ARPAI

Mikrobiologické oddelenie, Výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, Bratislava

Došlo 6. 11. 1956

Spórový materiál čistej, lebo jednotnej kultúry obsahuje individuá nerovnakej morfolologickej a fyziologickej hodnoty. Sledovanie tejto nerovnocennosti spór, ktorú možno posudzovať analogicky s nerovnocennosťou mikrobov v čistej kultúre (Krasilnikov 1951, Málek 1955) má popri význame teoretickom aj nanajvýš praktické zameranie z hľadiska kvality spórového materiálu pri selekcii a pri riadených metabolických procesoch. Na diferenciaciu spór majú preto prvoradý význam také rozlišovacie znaky, na základe ktorých by sa dali oddeliť ich biologicky rovnorodé frakcie, popri prípade i individuá, najmä so zvýšenou fyziologickou hodnotou alebo istou biologickou špecifičnosťou.

Rozlišovacím znakom, sledovanie ktorého sme si pri svojich selekčných prácach vytýčili za úlohu, bola sedimentačná rýchlosť spór, ktorá v zmysle Stokesovho zákona je funkciou váhy častice podmienenej jej rozmermi a špecifickou váhou. Vychádzali sme pritom z pracovnej hypotézy, ktorá sa sčasti opierala o poznatky závislosti rozmerov a váhy spór niektorých nižších húb od ich lokalizácie na reprodukčných orgánoch (Falck 1927) a od štádia ich fyziologickej zrelosti. Treba zdôrazniť, že metodická aplikácia takejto diferenciacie predpokladá vylúčenie fyzikálnych a chemických vplyvov prostredia, ktoré môžu zmeniť geneticky podmienenú váhu, popri prípade špecifickú váhu spór (Lilly, Barnett 1951, Sörgel 1955).

Fyziologickú hodnotu spór sme sledovali na základe produkcie itakónovej kyseliny monosporickými kultúrami.

Metódy a materiál

Mikroorganizmus. Pri selekcii sme vychádzali zo spórového materiálu piatich kmeňov *Aspergillus terreus* Thom. Dva kmene, označované ako kmeň 1 a kmeň 2, sme dostali z výskumného pracoviska n. p. Lachema, Brno. Boli farby hnedej a vyznačovali sa charakteristickými znakmi variety *floccosa* (Thom a Raper 1945). Ďalší kmeň (kmeň 3) bol vlastným UV-variantom zlatožltej farby, zodpovedajúci popisu variety *aurea* (Thom a Raper 1945). Uvedené tri kmene sa vyznačovali vrásčitým mycéliovým povrchom. Kmene štvrtý a piaty sme získali z Prírodovedeckej fakulty Komenského univerzity v Bratislave. Podľa farby a morfológie sa mohli kmene 4 a 5 zaradiť medzi druhy *Aspergillus niveus* Blochwitz. Kmene sa počas pokusov štrnásťdenným preočkovaním udržiavali na sladinke s agarom o pH asi 6. Kultivačná teplota obnášala 25 °C, vysporulované kultúry, t. j. po 4–5 dňom kultivovaní, sme zbývajúce dni držali pri izbovej teplote.

Metódy frakcionácie spór. Spórový materiál sedemdnovej kultúry sme frakcionovali na princípe sedimentácie. Rušivé vplyvy neúplnej disperzie spór v suspenzii sa prakticky odstránili sterilnou filtráciou cez hodváb vhodnej pórovitosti (Sumi 1928) a použitím tween 80 na zníženie povrchového napätia.

Postupovali sme týmito 4 pracovnými postupmi: 1. Nahromadením ťažších spór čiastočným odstrednením metódou, obdobnou postupu zaužívaného pri šľachtení kvasiniek (Beran 1953). Koncentrácia použitej spórovej suspenzie bola upravená na $2 \cdot 10^6$ až $3 \cdot 10^6$ spór/ml. Túto veličinu sme kontrolovali priamym počítaním v komôrke podľa Bürkera. Odstrednená frakcia, ktorá poskytovala materiál na monosporickú izoláciu, obsahovala asi 25 % celkového množstva spór.

2. Sedimentáciou vo vzdušnom stĺpci, t. j. voľným pádom, na princípe stanovovania veľkosti častíc (Gooden a Smith 1940, Sovová a Krumphanzlová 1953), pri aplikácii sterilnej sklenenej trubice, uzavretej priliehajúcimi viečkami Petriho misiek. Horné viečko malo na svojom dne nediferencovaný spórový materiál, spodné tenkú vrstvu agarovej pôdy. Spóry, ktoré v kolmo postavenom valci ako prvé sedimentovali, slúžili k monosporickej izolácii. Priebeh sedimentácie sa kontroloval na základe mikroskopického sledovania spodných viečok, ktoré sa periodicky vymieňali. Podrobnejšie usporiadanie pokusu, ako aj údaje o rýchlosti sedimentácie a závislosti kvantitý sedimentovaných spór od doby usadzovania sú publikované na inom mieste (Arpai 1957).

3. Sedimentáciou vo vodnom stĺpci, pričom sme opäť vychádzali z princípu metódy používanej na stanovenie hmoty častíc v tekutom médiu (Andreasen 1953). Použili sme sterilne sedimentačné trubičky, v ktorých sme udržiavali stálu hladinu a teplotu vody, kde sme cez horný uzáver Pasteurovou pipetou vniesli štandardný nediferencovaný spórový materiál. Spodný zabrúsený otvor trubičky priliehal na dno Lindnerovej komôrky, v ktorej sa zachytávali kvapky spolu s usadzujúcimi sa spórmi. Obdobne ako u predchádzajúceho pracovného postupu sa v intervaloch vymieňala záchytná miska, aby sa kontrolovala prítomnosť spór. Prvé kvapky, obsahujúce spóry, poskytovali materiál k monosporickej izolácii. O bližších údajoch techniky, výpočtu a priebehu sedimentácie spór vo vode sa hovorí v našej práci, citovanej tiež pri predchádzajúcom postupe.

4. Medzilamelovým odstrednením, spočívajúcim v centrifugovaní spórovej suspenzie medzi vrstvami chromatografických papierov, uložených medzi rotujúcimi taniermi bubnovej odstredivky, pričom papierom prechádza prúd vody nasávaný z centrály, t. j. na rotačnej ose umiestenej nádrže, ktorý je z okrajov taniera vymrštený. Prvé kvapky so spórmi, ktoré boli zachytené v sterilnom obalovom bubni, dávali materiál na monosporickú selekciu. Schémy aparatury a podrobnosti pracovnej techniky sú tým istým spôsobom publikované ako pri predchádzajúcich postupoch.

Monosporická izolácia a kultivačné metódy. Monosporická izolácia se prevádzala zo spóroveho materiálu sedemdennej kultúry, resp. frakcie spór príslušným spôsobom oddelenej, pomocou násadného monosporického izolátora (Nečásek, Palečková a Tesař 1954). Po desaťdennej kultivácii boli spóry použité k inokulácii fermentačnej pôdy (Lockwood 1954). V pôde bola glukóza nahradená kukuričným cukrom rovnakej koncentrácie (6,6 % — Arpai 1956). Použitý kukuričný extrakt bol biologickým testom štandardizovaný, čím sa vylúčila jedna premenlivá veličina, ovplyvňujúca priebeh fermentácie (Jurmánová a Arpai 1955). Erlenmeyerove banky o 200 ml obsahovali 60 ml substrátu, ktorý bol po inokulácii stacionárnym spôsobom kultivovaný pri teplote 32 °C. Kvasenie sa ukončilo, keď obsah cukru v médiu poklesol pod 1 %.

Analytické metódy. Produkcia celkovej acidity sa stanovovala titračne pomocou 0,1 N-KOH za použitia fenolftaleínu ako indikátora. Kvantita itakónovej kyseliny sa určovala bromáciou (Friedkin 1945), kvalita sa preverovala chromatograficky na švajčiarsky štandard (Halliwell 1952). Spotreba cukru sa kontrolovala na základe analytiky redukujúcej zložky média jodometricky na soli mednaté (Tomíček 1950).

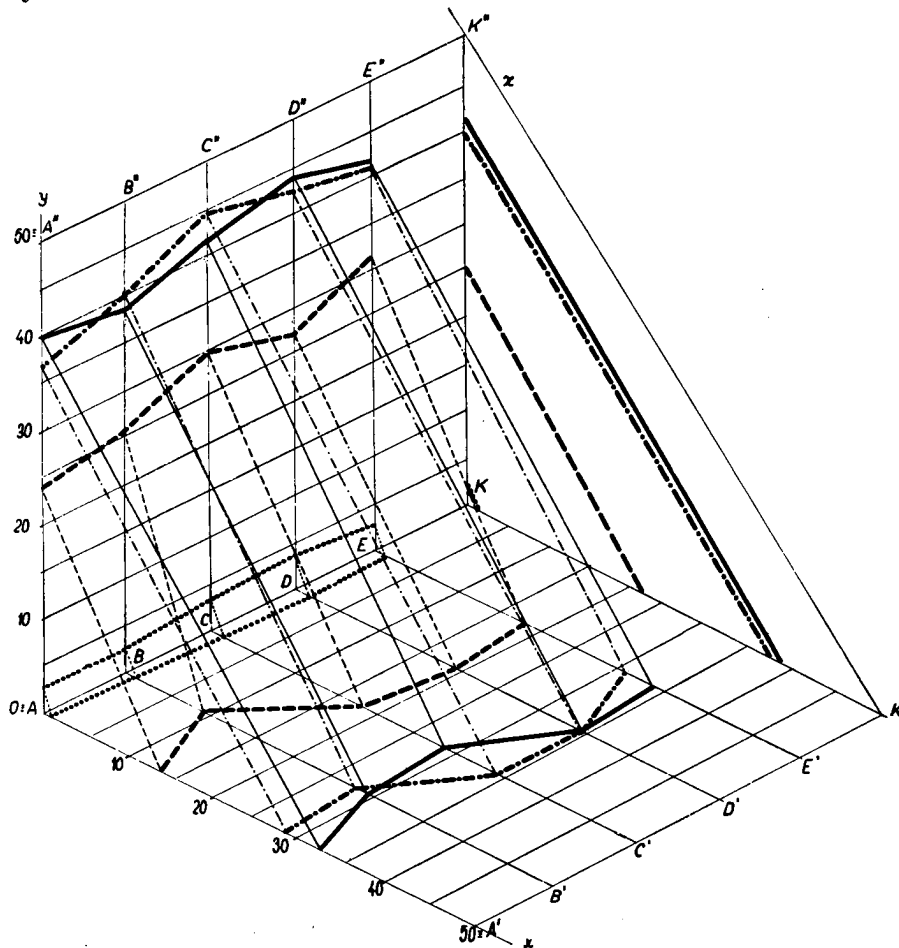
Vyhodnotenie pokusov. Pri vyhodnotení pokusov sa za základ účinnosti selekcie brala produkčná schopnosť neselektovaných základných piatich kmeňov. Produkcia itakónovej kyseliny je vyjadrená v percentách produkovanej itakónovej kyseliny vypočítaných z váhového pomeru itakónovej kyseliny, analyticky stanovenej v štandardnom množstve prekvaseného média k obsahu cukru v médiu pred fermentáciou. Na základe desiatich paralelne opakovaných pokusov sme v každom sledovanom prípade vyznačili dve produkčné kritériá, maximálnu produkciu a priemernú produkciu.

Do akej miery je frakcionácia nediferencovaného spóroveho materiálu užitočná z hľadiska selekčného efektu monosporickej izolácie, o tom svedčia percentuálne údaje o pomere priemernej produkcie izolátov získaných z frakcionovaných spór k priemernej produkcii izolátov získaných z nediferencovaného spóroveho materiálu. Efektívnosť príslušných oddeľovacích metód u jednotlivých kmeňov na základe štatistikom je tiež vyjadrená pomerom pravdepodobnosti výskytu izolátov s vyššou produkciou itakónovej kyseliny než je priemerná produkcia východiskového kmeňa selektovaných z nediferencovaného spóroveho materiálu k pravdepodobnosti výskytu takýchto izolátov pri selekcii z frakcionovaných spór. V každom prípade, t. j. u každého kmeňa a pri každej metóde sa vyhodnocovalo päťdesiat izolátov, ktoré dávali štatistický základný súbor.

Výsledky

Kritériá produkčnej schopnosti, t. j. údaje maximálnej a priemernej produkcie jednotlivých základných kmeňov a ich izolátov, získaných podľa príslušných metód, ako tiež ich vzájomné vzťahy, sú graficky znázornené na obraze 1. Hodnoty maxi-

málnej produkcie zo súboru izolátov jednotlivých kmeňov sú nanesené vo smere osi y ; príslušné hodnoty priemernej produkcie sú vo smere osi x . Výsledky selekcie prevádzanej na nediferencovanom spórovom materiáli sa nachádzajú v rovine A, A', A'' . Pri selekcii vychádzajúcej z frakcionácie čiastočným odstredením sme získali výsledky ktoré sú uvedené v rovine B, B', B'' , podobne sú hodnoty produkčných



Obr. 1. Maximálne a priemerné produkcie izolátov a ich základných kmeňov pri použití frakcionovaného a nediferencovaného spórového materiálu.

Os x : hodnoty priemernej produkcie itakónovej kyseliny v percentách, os y : hodnoty maximálnej produkcie itakónovej kyseliny v percentách, os z : poloha spojnic k sebe príslúchajúcich hodnôt produkčných kritérií. V rovine A, A', A'' produkčné kritériá izolátov nediferencovaného spórového materiálu, v rovine B, B', B'' obdobne pri frakcionácii čiastočným odstredením, v rovine C, C', C'' obdobne pri frakcionácii sedimentáciou voľným pádom, v rovine D, D', D'' obdobne pri frakcionácii sedimentáciou vo vodnom stĺpci, v rovine E, E', E'' obdobne pri frakcionácii medzilamelovým odstredením. V rovine K, K', K'' produkčné kritériá základných kmeňov. Kmeň 1 ———, kmeň 2 - - - - -, kmeň 3 - · - · - ·, kmeň 4 · · · · ·, kmeň 5 neproduktívny.

kritérii izolátov získaných zo spórovej frakcie oddelenej sedimentáciou vo vzduchu zakreslené do roviny C, C', C'' a tie, ktoré sa získali metódou sedimentácie vo vodnom stĺpci, sú v rovine D, D', D'' . Zo spórového materiálu frakcionovaného pomocou medzilamelového odstredenia selektované izoláty dávali výťažky, ktoré sú vyhodno-

tené v rovine E, E', E''. Na porovnávanie slúžiace údaje produkčnej schopnosti základných kmeňov sú na príslušných osách v rovine K, K', K''.

Z popísaného grafu vidíme, že kmene 1 a 2 predstavujú ďaleko najvýkonnejších producentov, v ktorých maximálna produkcia sa pohybovala okolo 40 % a priemerná produkcia okolo 37 %. Kmeň 3, ktorý sa ukázal byť produkčne menej vyrovnaný, vykazoval maximum okolo 24 %, priemer okolo 20 %. Kmeň 4 predstavoval nešlachtený „divoký“ kmeň s minimálnymi výnosmi itakónovej kyseliny, kým kmeň 5 bol za všetkých pokusov s izolátmi na itakonovú kyselinu neproduktívny a preto nemohol byť ani z vytýčených hladísk vyhodnotený.

Pospájaním súhlasných bodov maxima a priemeru produkcie sme vyznačili priamky, dĺžka ktorých je funkciou maximálnej a priemernej produkcie izolátov a je teda vyhodnocovateľná ako ukazovateľ produkčnej schopnosti izolátov získaných príslušnou metódou. To znamená, že čím je dĺžka väčšia, tým je vyššia účinnosť selekcie. Keďže príslušné dlhšie spojky sú v rovinách, v ktorých sú vyznačené produkcie dosiahnuté spórovým materiálom diferencovaným na základe sedimentácie, t. j. predovšetkým v rovinách C, C', C'' a D, D', D'', frakcionácia sa názorne javí vo zvýšení efektívnosti selekcie. Ak porovnáваме grafické údaje izolátov s príslušnými grafickými hodnotami základných kmeňov, ktoré sú zakreslené v rovine K, K', K'', môžeme vyhodnotiť vzťahy produkčných maxim i priemerov. Pritom sa nám názorne ukazuje tá okolnosť, že pri danom počte izolácií sme ojedinele získali producentov o vyššej produkcii než mal základný kmeň iba vtedy, ak sme izolácie previedli zo selektívnej frakcionácie, znázornenej hodnotami opäť v rovinách C, C', C'', resp. D, D', D''.

V prípade, že sa selekcia prevádzala na nediferencovanom spórovom materiáli, žiaden z izolátov nedosiahol maximálnu produkciu základného kmeňa. Ak sa produkcia izolátov vzťahuje na priemernú produkciu príslušného základného kmeňa, zisťujeme, že u kmeňa 1 len 8 %, u kmeňa 2 ani jedno percento, u kmeňa 3 iba 6 %, u kmeňa 4 relatívne najviac, t. j. 10 % izolátov dosiahlo, resp. prekročilo hodnotu priemernej produkcie príslušného základného kmeňa.

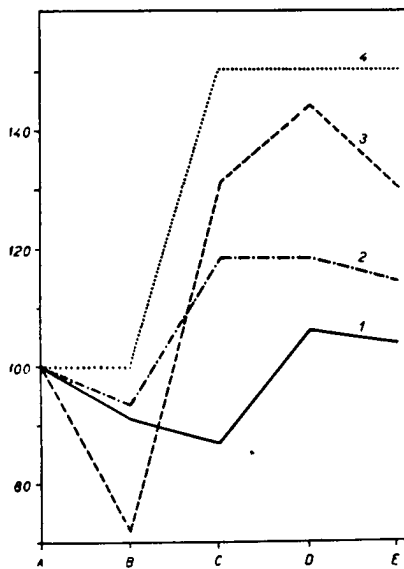
Výsledky selekcie, vychádzajúce pri monosporickej izolácii z frakcionovaných spórových materiálov, dávali vo vzťahu na maximálnu produkciu základného kmeňa, pri použití metódy čiastočného odstredenia, iba u 2 % izolátov kmeňa 2 malé zvyšovanie produkcie itakónovej kyseliny. Vo vzťahu na priemerné výnosy základného kmeňa obnáša podiel plusvariantov 4 % u kmeňa 1, 6 % u kmeňa 2, 12 % u kmeňa 3, až 20 % z celkového počtu izolátov u kmeňa 4.

Pri oddelení časti spórového materiálu podľa sedimentačnej metódy vo vzdušnom stĺpci sme dostali izoláty, ktoré u kmeňov 1, 2 a 3 v rozsahu 6 % celkového sledovaného súboru mali vyššiu produkciu itakónovej kyseliny, ako mal príslušný základný kmeň. U kmeňa 4 činil tento podiel iba 2 %. Pri vyhodnotení výsledkov v pomere k priemernej produkcii základného kmeňa činí podiel plusvariantov 10 % u kmeňa 1, až 36 % u kmeňa 2, 20 % u kmeňa 3 a 26 % z celkového počtu izolátov u kmeňa 4.

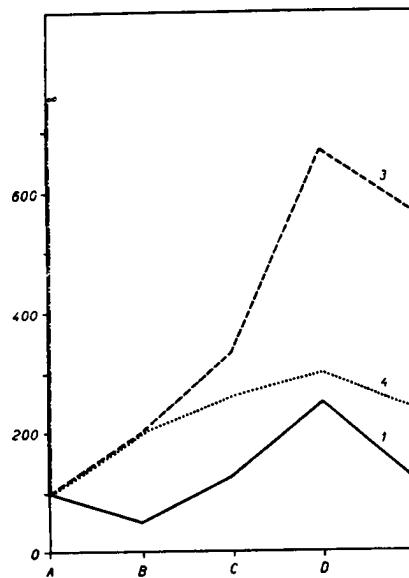
Pri použití tretej separačnej metódy, spočívajúcej na usadzovaní vo vodnom stĺpci dosiahlo 6 % izolátov kmeňa 1, 2 % izolátov kmeňa 2, 8 % izolátov kmeňa 3 a 2 % izolátov kmeňa 4 vyššej produkcie itakónovej kyseliny než je maximum u základného kmeňa. Vo vzťahu k priemernej produkcii príslušného základného kmeňa vychádza, že 18 % izolátov kmeňa 1, až 30 % izolátov kmeňa 2, až 40 % izolátov kmeňa 3 a 30 % izolátov kmeňa 4 možno pokladať za plusvariantov.

Frakcionácia medzlamelovým odstredением priniesla tieto výsledky: zvýšenie produkcie oproti maximu príslušného základného kmeňa činilo u kmeňa 1 iba 2 %, 6 % u kmeňa 2, u kmeňa 3 až 8 % z celkového vyhodnoteného súboru izolátov,

kým oproti priemernej produkcii až 10 % izolátov kmeňa 1, či 24 % izolátov kmeňa 2, lebo 34 % izolátov kmeňa 3 a 24 % izolátov kmeňa 4 javilo vyššiu produkciu itakónovej kyseliny. Produkčnú variabilitu sledovaných spórových materiálov v závislosti od frakcionácie znázorňuje grafické hodnotenie na obraze 2, na ktorom je vyjadrený percentuálny pomer priemernej produkcie izolátov získaných z frakcionovaných spór k priemernej produkcii izolátov získaných z nediferencovaného spórového materiálu. Z tohto obrazu je zjavný zvýšený selekčný efekt, ktorý bol dosiahnutý pri použití frakcionácie.



Obr. 2. Pomer priemernej produkcie izolátov získaných z frakcionovaných spór k priemernej produkcii izolátov získaných z nediferencovaných spór.



Obr. 3. Pomer pravdepodobnosti výskytu izolátov s vyššou produkciou než je priemerná produkcia základného kmeňa pri použití nediferencovaného a frakcionovaného spórového materiálu.

Os x: A = izoláty nediferencovaného spórového materiálu, B = izoláty frakcionované čiastočným odstredením, C = izoláty frakcionované sedimentáciou vo vzdušnom stĺpci, D = izoláty frakcionované sedimentáciou vo vodnom stĺpci, E = izoláty frakcionované medzilamelovým odstredením. Os y: percentuálny pomer. Krivka 1 – kmeň 1, 2 – kmeň 2, 3 – kmeň 3, 4 – kmeň 4.

Efektívnosť selekcie bola vyjadrená aj vyhodnotením štatistického materiálu na pravdepodobnosť výskytu izolátov s vyššou produkciou itakónovej kyseliny než je priemerná produkcia východiskového kmeňa. Pomer týchto pravdepodobností, t. j. pravdepodobnosti pri selekcii z frakcionovaného a pravdepodobnosti pri selekcii z nediferencovaného spórového materiálu je percentuálne vyjadrený na obraze 3, z ktorého je názorne vidno, že izolácia produkčného plusvarianta je až mnohonásobne pravdepodobnejšia v tých prípadoch, v ktorých sa používa spórový materiál frakcionovaný, pričom efektívnosť selekcie je tiež podmienená, či v závislosti od výberovosti frakcionácie (Arpai 1957).

Diskusia

Z uvedených výsledkov vyplýva, že pri relatívne malom počte izolátov sa iba vtedy podarilo získať producentov itakónovej kyseliny o vyššej aktivite ako mal východiskový kmeň, ak sa pri izolácii použila frakcia spórového materiálu o najvyššej sedimentačnej rýchlosti. Pomerne obšírny pokusný materiál poukazuje na to, že u sledovaných mikroorganizmov spozorovaná súvislosť nie je nahodilá, ale predstavuje závislosť genetických vlastností spór na faktoroch podmieňujúcich rýchlosť sedimentácie, t. j. na váhe, lebo na špecifickej váhe korelovanej na rozmeroch častice. Treba sa však pýtať, aká je platnosť tohto poznatku. Je obmedzený na pomerne úzky okruh produkčných podmienok kyseliny itakónovej alebo platí aj na spóry iných druhov produkčných mikroorganizmov? Nepodarilo sa nám nájsť v literatúre zmienky o sledovaní tejto závislosti, ak odhliadneme od práce, ktorá sledovala súvis medzi tvarom, či povrchom spór a produkčnou schopnosťou kyseliny citrónovej u kmeňov *A. niger* (Lewis a Johar 1952). Z výsledkov tejto práce vyplýva, že je potrebné študovať, ako sa prejavuje sledovaný znak spóry na fyziológiu jej kultúry. V predloženej časti práce, ako aj pri ďalších selekciách (Arpai, Foltýn a Janotková 1957) sme prihliadali iba na istú produkčnú schopnosť, je však veľmi pravdepodobné, že váha spóry bude mať svoj odraz aj z iných fyziologických hľadísk. Tento predpoklad sme si overili v druhej časti našej práce, v ktorej sme hľadali a tiež našli závislosť medzi letálnymi a mutačnými účinkami ultrafialového žiarenia a frakcionáciou spórového materiálu producentov kyseliny itakónovej. Tiež táto časť práce bude uverejnená.

Súhrn

V rámci selekčných prác, zameraných na vyhľadávanie producentov itakónovej kyseliny o zvýšenej aktivite, sa sledovali produkcie monosporických izolátov, ktoré sa získali z piatich rozličných kmeňov *Aspergillus terreus* Thom. Izolácie sa prevádzali jednak obvyklým spôsobom, t. j. za použitia nediferencovaného spórového materiálu, jednak z jeho frakcie o najväčšej sedimentačnej rýchlosti.

Frakcionácia sa prevádzala za použitia metódy čiastočného odstredenia, usadzovania vo vzdušnom stĺpci, usadzovania vo vodnom stĺpci a medzilamelového odstredenia.

Keďže sa pri relatívne nižšom počte izolátov podarilo získať producentov o vyššej aktivite ako mal príslušný základný kmeň, pomerne väčším podielom iba vtedy, keď sa vychádzalo pri selekcii z frakcionovaného spórového materiálu, vyhodnocujú sa dosiahnuté výsledky v tom zmysle, že spórový materiál u *A. terreus*, rozlišovaný svojou väčšou sedimentačnou rýchlosťou, poskytuje s väčšou pravdepodobnosťou produkčne aktívnejšie izoláty ako v nediferencovanom stave.

V rámci diskusie sa poukazuje na to, že frakcionáciu bude možno použiť aj z iných selekčných hľadísk.

Literatúra

- Andreasen, H.: *Beispiele der Verwendung der Pipette-Methode bei der Feinheitsanalyse unter besonderer Berücksichtigung der Feinheitsuntersuchungen von Mineralfarben*. Angewandte Chemie 48 : 283, 1953.
- Arpai, J.: *Za rozšírenie surovínovej základne priemyslu pomocou kvasnej výroby itakónovej kyseliny*. Kvasný priemysl 2 : 12, 1956.
- Arpai, J.: *Selekcia producentov kyseliny itakónovej*. Dizertačná práca VÚPP, Bratislava 1957.
- Arpai, J., Foltýn, O., Janotková, O.: *O antižungálnej aktivite izolátov Trichothecium Link so zvláštnym zreteľom na ich antagonizmus voči Plasmopara viticola*. Biológia 12 : 266, 1957.
- Beran, K.: *Šlechtní kvasinky Torulopsis utilis var. major*. Průmysl potravin 4 : 485, 1953.

- Falcik, R.: *Über die Grössen, Fallgeschwindigkeit und Schwebewerte der Pilzsporen*. Berichte der dtsh. bot. Ges. 45 : 262, 1927.
- Friedkin, M.: *Determination of itaconic acid in fermentations liquors*. Ind. Eng. Chem. An. Ed. 17 : 637, 1945.
- Gooden, L., Smith, J.: *Measurement of average diameter of small particles*. Ind. Eng. Chem. An. Ed. 12 : 479, 1940.
- Halliwell, G.: *Chromatografic detection of acids in cultures of Aspergillus niger on various substrates*. Nature 196 : 1063, 1952.
- Jurmannová, K., Arpai, J.: *Produkty kukuričnej škrobárne ako základné suroviny kvasnej výroby itakónovej kyseliny*. Dni novej techniky škrobárenského priemyslu, Smolenice 1955.
- Krasifnikov, N. A.: *Vnútri- i mezvidovyje antagonističeskije vzaimootnošeniya u mikroorganizmov*. Usp. sovr. biol. 31 : 346, 1951.
- Lewis, J. S., Johar, D. S.: *Über Grösse und Aussehen der Aspergillus-niger-Sporen im Verhältnis zum Zitronensäureertrag*. Bull. centr. Foodtechnol. Res. Inst. Mysore 2 : 16, 1952, podĽa Chem. Zbl. 125 : 3047, 1954.
- Lilly, V., Barnett, H.: *Physiology of the fungi*. 1951. V ruskom preklade; *Fiziologija gribov*. Izdat. inostrannoĵ literatury, Moskva 1953.
- Lockwood, L. B.: V knihe *Industrial fermentations*. Vol. 2. New York 1954.
- Málek, I.: *O množení a pěstování mikroorganismů, zvláště bakterií*. Nakladatelství ČSAV Praha 1955.
- Nečásek, J., Palečková, Fr., Tesař, A.: *Monosporická izolace hub*. Preslia 26 : 105, 1954.
- Sovová, M., Krumphanzlová, J.: *Zjišťování velikosti částic několika mikronů u potravinářských výrobků*. Sborník vědeckých prací potravinářského průmyslu. St. nakl. techn. literatury, Praha 1953.
- Sörgel, G.: *Zur Wirkung der Temperatur auf die Grösse von Pilzsporen*. Die Naturwissenschaften, 42 : 565, 1955.
- Sumi, M.: *Über die chemischen Bestandteile der Sporen von Aspergillus oryzae*. Bioch. Zsch. 195 : 161, 1928.
- Thom, C., Raper, K.: *A manual of the Aspergilli*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore 1945.
- Tomíček, O.: *Kvantitativna analýza*. Jedn. čs. mat. a fyz., Praha 1950.

Селекционные работы с дифференцированными по весу конидиями грибка *Aspergillus terreus* Thom. I.

Самопроизвольная неравноценность спор чистой культуры

Я. Арпай

Р е з ю м е

В рамках селекционных работ, направленных на поиски продуцентов итаконовой кислоты, обладающих повышенной активностью, исследовалась продукция моноспорических изолятов, которые получались от 5 различных штаммов *Aspergillus terreus* Thom. Изоляция производилась как обычным способом, т. е. с применением недифференцированного материала спор, так и из его фракции с наиболее значительной скоростью седиментации. Фракционирование осуществлялось по методу частичного центрифугирования, осаждения в воздушном столбе, осаждения в водном столбе и межпластиночного центрифугирования. При сравнительно небольшом количестве изолятов, продуценты с более высокой активностью, чем у соответствующего основного штамма, удавалось получить в относительно большем количестве только тогда, если селекция основывалась на фракционированном материале спор. Поэтому мы рассуждаем полученные нами результаты в том смысле, что споры *Asp. terreus*, отличающиеся более значительной скоростью седиментации, дают, вероятно, более продуктивные изоляты, чем недифференцированные споры. В обсуждении отмечается, что фракционирование можно будет использовать и для других целей селекции.

Selecting Conidia of the Mould *Aspergillus terreus* Thom.
Differentiated according to Weight. I.

Natural Inequality of Pure Cultures

J. Arpai

S u m m a r y

As part of selective work investigating the strains capable of producing itaconic acid with higher activity, a study was made of the production of cultures from single spores isolated from five different strains of *Aspergillus terreus* Thom. Isolation was carried out by the usual method, i. e. using non-differentiated spore material, and also using the fraction with the highest sedimentation rate. Fractionation was carried out using the method of partial centrifugation, sedimentation in a column of air, sedimentation in a column of water and interlamellar centrifugation. Since a relatively higher proportion of producers with high activity was obtained in a lower number of isolated spores than in the corresponding basic strain only when selected, fractionated spore material was used, the results are evaluated as demonstrating that spore material from *Aspergillus terreus* differentiated according to higher sedimentation rate is more certain to give cultures with a higher degree of active production than non-differentiated material. It is pointed out in the discussion that fractionation can also be utilized in relation to other aspects of selection.

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

ročník 2. (1957) — č. 4

Amylolytická účinnost mycelia plísně *Aspergillus niger*
odpadajícího při výrobě kyseliny citronové*

ZDENĚK FENCL, MIKULÁŠ BURGER A KAREL BERAN

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 2. 4. 1957

Z dřívějších prací je známo, že α -D-glukosidáza (maltáza) plísně *Aspergillus niger* hydrolyzuje škrob nezávisle na α -amyláze (Burger a Beran 1954, 1956). Tento enzym má velkou aktivitu k hraničním dextrinům. Vzhledem k poměrně malé aktivitě sladu vůči uvedeným dextrinům chtěli jsme využít jako zdroje tohoto enzymu mycelia plísně z některé kvasné výroby, ve které se používá plísně *A. niger*. Takovou výrobou je na příklad produkce kyseliny citronové kvasnou cestou. Bylo nutno předpokládat, že za podmínek, při nichž probíhá tvorba kyseliny citronové, budou u plísně inaktivovány úplně amylázy a i aktivita α -D-glukosidázy bude nižší než u preparátů plísně zvláště pro tento účel kultivovaných. U mycelia získaného jako odpad jiného fermentačního procesu nebylo možno žádat, aby mělo předem požadované optimální vlastnosti. Úkolem práce je — při podmínkách předem daných výrobou kyseliny citronové — upravit ekonomickým způsobem mycelium tak, aby jeho enzymatická aktivita byla dostatečná pro žádaný účel. Zabývali jsme se proto studiem optimálních podmínek úpravy mycelu s co největší diastatickou aktivitou.

Na rozdíl od α -amylázy, která štěpí škrobovou a dextrinovou molekulu asi uprostřed uhlíkatého řetězce, čímž se dosahuje rychlého ztekucení substrátu, odštěpuje α -D-glukosidáza z makromolekuly škrobu pouze glukosové zbytky (Burger a Beran 1956). Proto ztekucování škrobového mazu probíhá při působení enzymatického preparátu z plísní, jejichž hlavním amylytickým systémem je maltáza, pomaleji. Zaměřili jsme tedy své práce na hledání vhodné kombinace dvou enzymatických systémů, a to maltásového z odpadního mycelia a amylásového ze sladu, které dovoluje v tomto případě dosáhnout maximálního efektu při hydrolyse škrobu na zkvasitelné cukry.

Materiál a metody

Odpadní mycelium a jeho úprava. K přípravě preparátu jsme použili mycelia plísně *Aspergillus niger*, odpadajícího při výrobě kyseliny citronové kvasnou cestou v Chemických závodech J. Fučíka v Kaznějově. Citronová kyselina byla z mycelia odstraněna několikanásobným propráním proudem studené nebo horké vody a zbylá voda částečně odstraněna vylisováním mezi vrstvou filtračního papíru. K stanovení enzymatické aktivity jsme používali suchého, na prach rozetřeného mycelia nebo vlhkého lisovaného mycelia. Vlhké mycelium jsme roztírali za přídavku mořského písku. Pro laboratorní výtěž-

* Výrobní postup chráněn pat. přihláškou M. Burger, K. Beran, Z. Fencl, P. V. 3525 z roku 1955.

nostní pokusy jsme použili suchého, na prach rozetřeného mycelia. Pro autolysu a sledování sekundárního nárůstu plísně jsme napěchovali mycelium v množství 1–2 kg do silnostěnných skleněných nádob a podle pokusu uchovávali buď při teplotě místnosti nebo v termostatu při níže uvedených teplotách.

Příprava laboratorních zápar. Laboratorní zápary jsme připravili z bramborových vloček o obsahu 65,68 % škrobu. K ztekucení a zcukření těchto zápar jsme jako pomocného a srovnávacího diastatického preparátu používali sušeného diastatického sladu. Bramborové vločky o váze 30,5 g (t. j. 10 % konečné koncentrace škrobu) byly za sucha promíchány s příslušným množstvím myceliového preparátu nebo současně s 0,2 g jemně mletého sladu v 500 ml varných baňkách. Předběžnými pokusy bylo zjištěno, že uvedené množství sladu dostačuje k ztekucení zápary. Ve srovnávacích pokusech jsme k ztekucení a k zcukření použili 10 % sladu na množství použitého škrobu. Směs bramborových vloček a enzymatických preparátů jsme rozmíchali ve 190 ml 45° teplé vody a baňky jsme ponořili do vodní lázně. U pokusů s myceliovým preparátem byly udržovány 1 hodinu při teplotě 65 °C, u kontrolních pokusů se sladem 1 hodinu při 55 °C. Po zcukření a ochlazení byl obsah baňek zakvašen 10 ml suspence kvasinek R XII ředěné tak, aby konečná koncentrace kvasničné sušiny v zápare byla 0,5 %. Baňky byly uzavřeny kvasnou zátkou a umístěny v termostatu. Kvašení probíhalo při 28 °C 72 hodiny.

Analytické metody. Enzymatickou aktivitu mycelia jsme stanovili upravenou metodou Wohlgeuthovou (Belozerskij a Proskurjakov 1951). Touto metodou byla zjišťována jeho dextransázová aktivita. pH při pokusu bylo upraveno acetátovým pufrům a kolísalo mezi 3,9–4,6, při čemž v těchto rozmezích nemá podstatný vliv na aktivitu enzymu (Beran a Burger 1956). Při stanovení sušiny mycelia jsme sušili lisované mycelium 4–5 hodin při 80 °C a dále při 105 °C do konstantní váhy. Přítomnost zbylého škrobu v prokvašených záparách byla zjišťována jodometrickými testy. Alkohol v záparách byl po dvojnásobné destilaci stanoven pyknometricky. Výtěžky z laboratorních kvasných pokusů jsou uvedeny jako procenta teoreticky možného výtěžku, vyčísleného z množství přítomného škrobu pomocí stechiometrického vztahu Gay-Lussacova.

Výsledky a diskuse

Optimální podmínky přípravy enzymatického preparátu z odpadního mycelia

Při přípravě preparátu v provozním měřítku je nutno uvažovat o několikahodinové době mezi oddělením odpadního mycelia od substrátu a usušením. V této době

Tab. 1. Orientační studie o vlivu praní, skladování a sušení mycelia na jeho enzymatickou aktivitu

Pokus	Úprava mycelia	Aktivita
1	mycelium ihned po vynětí z kvasné misky (kyselý)	0,50
2	mycelium viz pokus 1 a propráno horkou vodou (80–90 °C)	bez aktivity
3	mycelium viz pokus 1 a propráno studenou vodou	0,46
4	mycelium viz pokus 3 a usušeno v proudu vlažného vzduchu (30–40 °C)	0,33
5	mycelium viz pokus 3 a udržováno po 8 hodin při teplotě přibližně 40 °C	0,75
6	mycelium viz pokus 5 a usušeno v proudu vlažného vzduchu	0,70

Poznámka: údaje aktivit jsou vztaženy na sušinu.

je nutno odstranit v myceliu přítomnou kyselinu citronovou elucí vodou a lisováním. V myceliu zatím proběhne mnoho změn, jako na příklad oxydace endogenního substrátu, spojené s případným zvýšením teploty, dále autolysa a růst sekundárního mycelia. Nevhodná teplota vody při eluci a vzduchu v sušárně může deaktivovat enzym. Orientační studie o vlivu uvedených faktorů je uvedena v tabulce 1.

Jak je patrné, vede odstraňování citronové kyseliny vyluhováním horkou vodou, jak se ho dnes běžně ve výrobě používá, k deaktivaci preparátu. Naproti tomu propráním studenou vodou a lisováním se při dokonalém odstranění citronové

kyseliny způsobí jen nepatrný pokles aktivity. Sušením v proudu vlažného vzduchu se aktivita snižuje asi o 10 %. Osmihodinová prodleva mezi elucí a sušením při zvýšené teplotě (40 °C) se projevila zvýšením aktivity preparátu nad původní hodnotu. Předpokládali jsme, že tento jev byl způsoben uvolněním většího množství maltázy částečnou autolysou mycelia nebo makroskopicky pozorovatelným růstem sekundárního mycelia bohatšího na maltázu. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky sledující tyto předpoklady. Protože však zvýšení aktivity takto upraveného mycelia klesne po promytí pod původní počáteční hodnotu, lze soudit, že rozhodující pro zvýšení aktivity je částečná autolýza mycelia, neboť je nepravděpodobné, že by krátké promytí odstranilo maltázu ze sekundárního mycelia, když při předchozích pokusech byl pokles aktivity vyvolaný mytím jen nepatrný. Autolysou uvolněná maltáza se však vodou jistě velmi rychle odstraní, což se projeví částečnou deaktivací preparátu.

Tab. 2. Vztah autolýsy a růstu sekundárního mycelia k aktivitě enzymatického preparátu

Pokus	Způsob úpravy mycelia	Aktivita
1	výchozí čerstvé mycelium	0,57
2	viz pokus 1 a vyprané studenou vodou	0,56
3	viz pokus 2 po 16 hodin autolýsy při 40 °C	1,00
4*	viz pokus 3 po vyprání studenou vodou	0,45

* preparát byl prorostlý sekundárním myceliem.

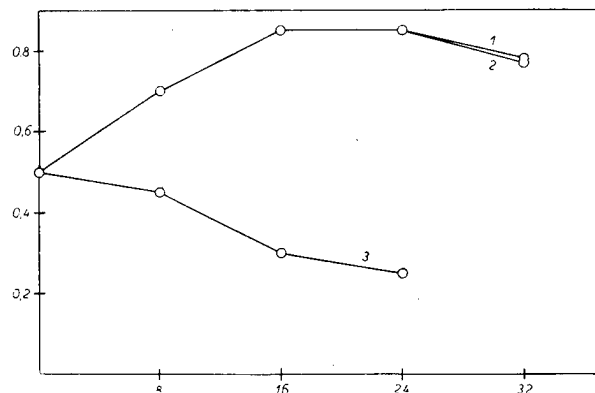
Tab. 3. Závislost aktivity suchého preparátu na době a teplotě autolýsy

Pokus	Doba hydrolysy v hod.	Teplota		Růst sekundárního mycelia	Aktivita
		ovzduší	mycelia		
1	0	—	—	—	0,50
2	8	20°	42°	ano	0,70
3	16	20°	42°	ano	0,85
4	24	20°	39°	ano	0,83
5	32	20°	39°	ano	0,78
6	8	32°	42°	ano	0,70
7	16	32°	42°	ano	0,85
8	24	32°	39°	ano	0,85
9	32	32°	39°	ano	0,77
10	8	50°	51°	ne	0,45
11	16	50°	52°	ne	0,30
12	24	50°	53°	ne	0,25
13	32	50°	52°	ne	bez znatelné aktivity

Mycelium bylo navrstveno do třilitrových kádinek a uloženo v termostatu při uvedených teplotách.

Ztráty aktivity částečně autolysovaného preparátu vyloučením vodou vedou k závěru, že je nutné, aby při výrobě byla doba mezi transportem mycelia z kvasné misky po vypuštění substrátu a odstraněním kyseliny citronové loužením a lisováním co nejkratší, neboť se tak udrží amylolytická mohutnost preparátu na nejvyšší míře.

Vývin tepla při spalování endogenního substrátu během autolysy může překročit optimální hodnoty a deaktivovat enzym. Proto jsme podrobili autolyse mycelium uchované při různých teplotách od 20–50 °C. Jak ukazuje tabulka 3 a obr. 1, zastavuje se při teplotě 50 °C růst sekundárního mycelia a je patrný značný pokles aktivity. Při nižších teplotách vývinem vlastního tepla se zvyšuje teplota mycelia



Obr. 1. Závislost aktivity na teplotě autolysy mycelia.
Osa x: doba autolysy v hodinách; osa y: aktivita preparátu; křivka 1 — autolysa při 20 °C; křivka 2 — autolysa při 32 °C; křivka 3 — autolysa při 50 °C.

na hodnoty kolem 40 °C, ať byl preparát umístěn v termostatu při 20 nebo 32 °C. Při 50 °C se již podstatně nezvýší teplota vlastního mycelia nad tuto hodnotu. Zřejmě je touto teplotou již zpomalena oxydace endogenního substrátu. Při autolyse probíhající za teploty kolem 40 °C se aktivita preparátu zvyšuje a mezi 16. až 24. hodinou se ustaluje na konstantní výši. V pozdějších hodinách je patrný jak malý pokles aktivity, tak i teploty, způsobený patrně úbytkem endogenního substrátu. V některých neuvedených pokusech se aktivita zvyšovala až do 32. hodiny a potom teprve nastal pokles. Lze proto předpokládat, že i za provozních podmínek bude 24 maximálně 32hodinová doba pro částečnou autolysu dostatečná.

Tab. 4. Vliv teploty sušení na aktivitu preparátu

Pokus	Podmínky sušení	Doba v hod.	Aktivita
1	30 °C	5	0,80
2	40 °C	4	0,80
3	50 °C	3,30	0,40
4	předsušeno při 30 °C dosušeno při 50 °C	1,30 3	0,75
5	předsušeno při 40 °C dosušeno při 50 °C	1 3	0,75

Při sušení preparátu se rovněž projevila závislost aktivity na teplotě. Podle údajů tabulky 4 neovlivňuje teplota vzduchu do 40 °C enzymatickou mohutnost preparátu, ale při teplotě 50 °C již došlo k jeho podstatné deaktivaci, které však bylo možno předejít předsušením preparátu při nižších teplotách. Inaktivace vlhkého enzymatického přípravku teplotou 50 °C je shodná s nálezy o inaktivaci

maltásy během autolysy při této teplotě. Desaktivace enzymu při uvedené teplotě, ačkoliv při ztekucování a zcukřování škrobu se používá a je i výhodnější teplota daleko vyšší, je pochopitelná, neboť při styku se substrátem je, jak známo, enzym mnohem stabilnější než v izolovaném stavu.

Zcukřování škrobnatých zápar enzymatickým preparátem

Účinnost enzymatického preparátu o aktivitě přibližně 0,8 dextrinačních jednic jsme si ověřili na produkci lihu ze zápar zcukřených tímto preparátem v laboratorních pokusech. V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky pokusů, kdy zápary byly

Tab. 5. Zcukřování zápar myceliovým preparátem za přítomnosti a v nepřítomnosti sladu

Myceliový preparát +0,2 g sladu		Myceliový preparát	
% preparátu na škrob	Výtěžek v %	% preparátu na škrob	Výtěžek v %
0	71,5		
5	69,2	12,5	55,3
15	84,4	50	93,2
25	88,7	75	96,4

zcukřovány preparátem z mycelia za přítomnosti nebo nepřítomnosti sladu. Značná zcukřovací schopnost samotného preparátu byla prokázána pokusy bez jakéhokoliv přídatku sladu. Výsledky, i když preparátu bylo přidáno značné množství, prokazují, že preparát sám může plně zastoupit slad, ovšem v takovém množství by provoz nebyl ekonomický. Při použití 50 % preparátu na váhu škrobu byla zápara značně hustá a lze předpokládat, že by v provozu takový postup působil značné obtíže. Je proto nutné využít maltásové aktivity preparátu při zcukřování zápar a zejména ztekucení provést sladem. Jak je patrné z tabulky, bylo dosaženo již při použití 15 % preparátu a 1 % sladu na přítomný škrob výtěžku 84,4 % teorie, což odpovídá 61,0 litru absolutního alkoholu ze 100 kg škrobu. Při koncentraci preparátu 25 % výtěžek se zvyšuje na 88,7 % teorie, což odpovídá 66 litrům absolutního alkoholu ze 100 kg škrobu. Ve srovnávacím pokusu s jedním procentem sladu dosáhly výtěžky hodnoty jen 71,5 %. S 10 % sladu na množství škrobu byly výtěžky o něco nižší než optimální výtěžky dosažené se samotným preparátem, po případě se směsí preparátu a sladu.

Jodometrické testy ukázaly, že v těch pokusech, kde nebyl při zcukření ke sladu přidán plísňový preparát (pokusy s 0,2 g sladu), byl v prokvašené zápare ještě zjištělný škrob. Za přítomnosti preparátu byl test negativní. To znamená, že přítomná maltása během kvašení dokončí přeměnu přítomného škrobu na glukosu, což je jedna z příčin, proč dosahujeme vyšších výtěžků lihu s plísňovými preparáty vzhledem ke sladu.

Z výsledků vyplývá, že plísňový preparát má značné zcukřovací schopnosti a při vhodné kombinaci se sladem je možno předpokládat i dobré výtěžky lihu v provozním měřítku. Odpadní mycelium z výroby kyseliny citronové může vhodnou úpravou získat obdobné vlastnosti jako plíseň *A. niger*, zvláště pěstovaná pro amylytické účely. Tento odpad představuje proto lehce dostupnou surovinu, vhodnou k výrobě enzymatického preparátu, kterým bude možno nahradit značné množství ječmene používaného pro přípravu sladu v zemědělském lihovarnictví.

Zároveň je zde dána praktická možnost ekonomicky výhodně nejen odstranit tento odpad při výrobě kyseliny citronové, ale ještě ve formě lihovarských výpalků jej výhodně využít jako krmiva.

Výsledky, které jsme v práci uvedli, jsme potvrdili provozními pokusy v zemědělském lihovaru a budeme o nich referovat na jiném místě.

Souhrn

Odpadní mycelium plísně *Aspergillus niger* po výrobě kyseliny citronové má značnou amylolytickou schopnost. K získání aktivního preparátu je nutno přítomnou kyselinu citronovou odstranit z mycelia promytím a vylisováním za studena. Autolysou vylisovaného mycelia při 40 °C po dobu 24—32 hodin se zvyšuje jeho dextransázová aktivita asi o 50 %. Preparát je nutno sušit maximálně při 40 °C, při dosušení je možno teplotu zvýšit na 50 °C.

Z laboratorních bramborových zápar s obsahem škrobu 10 % zcukřených 50 % preparátu na množství přítomného škrobu bylo získáno 93,2 % alkoholu vzhledem k teorii, 15 % preparátu s 1 % sušeného sladu na váhu škrobu dalo 84,4 % alkoholu. Odpadním myceliem po výrobě kyseliny citronové bude proto možno nahradit část sladu při zcukřování škrobnatých zápar v zemědělských lihovarech.

Akademiku Ivanu Málkovi děkujeme za zájem a podnětné připomínky při této práci. Za poskytnutí zkušebního materiálu a umožnění některých pokusů vyslovujeme poděkování Chemickým závodům J. Fučíka v Kaznějově. E. Masnerové a J. Pečenému děkujeme za pečlivou technickou spolupráci.

Literatura

- Beran, K., Burger, M.: *Studium optimálních podmínek pro zcukřování bramborových zápar plísními enzymatickými preparáty*. Čs. mikrobiol. 1 : 97, 1956.
Belozerskij, A. N., Proskurjakov, N. I.: *Praktičeskoe rukovodstvo po biochimiji rastenij*. Moskva 1951.
Burger, M., Beran, K.: *K otázce mechanismu hydrolysy dextransázou plísními enzymatickými preparáty*. Chem. listy 48 : 1394, 1954.
Burger, M., Beran, K.: *O mechanismu účinku maltázy plísně Aspergillus niger. I. Vliv teploty na aktivaci hydrolysy škrobu plísními preparáty*. Chem. listy 50 : 133, 1956.

Амилолитическая эффективность мицеллия плесени *Aspergillus niger*, отхода производства лимонной кислоты

З. Фенцль, М. Бургер и К. Беран

Резюме

Отходы мицеллия плесени *Aspergillus niger* при производстве лимонной кислоты обладают значительной амилолитической способностью. Для получения активного препарата необходимо отмыть из мицеллия остатки лимонной кислоты холодной водой и отжать его. Автолиз отжатого мицеллия при 40° С в течение 24—32 часов повышает его декстринирующую активность приблизительно на 50%. Просушивать препарат следует при температуре не выше 40° С. При досушивании можно повысить температуру до 50° С. Из лабораторных картофельных запаров, с 10% содержанием крахмала, путем декстринации 50% препарата (от количества присутствующего крахмала) было получено 93,2% спирта в сравнении с теорией. 15% препарата и 1% сушеного солода (от веса крахмала) дали 84,4% спирта. Поэтому отходами мицеллия при производстве лимонной кислоты можно будет заменить часть солода при осахаривании картофельных запаров в сельскохозяйственных винокурных заводах.

The Amyolytic Effectiveness of the Waste Mycelium of the Mould
Aspergillus niger from the Production of Citric Acid

Z. Fencel, M. Burger, K. Beran

S u m m a r y

Waste mycelium of the mould *Aspergillus niger* left from the production of citric acid has a high degree of amyolytic capacity. In order to obtain an active preparation, the citric acid must be removed from the mycelium by washing and pressing under cold conditions. Autolysis of the pressed mycelium at 40° C for 24—32 hours increases its dextrination activity by about 50%. The preparation should be dried at a temperature no higher than 40° C; for completing the drying process it can be raised to 50° C. From laboratory potato mashes with a 10% starch content, saccharified with 50% the amount of the preparation in relation to the amount of starch, a theoretical yield of 93.2% alcohol was obtained; 15% preparation and 1% dried malt in proportion to the weight of the starch gave 84.4% alcohol. Waste mycelium from the production of citric acid can therefore be used as a partial substitute for malt in the saccharification of starchy mashes in distilleries.

Československá
M I K R O B I O L O G I E
ročník 2. (1957) — č. 4

Příspěvek k zjišťování účinnosti fungitoxických sloučenin

Zkoušky fungistatické aktivity inhibující vegetativní formy mikroorganismů
v populacích

MIROSLAV BOMAR

Výzkumný ústav obalový, Praha

Došlo 31. 8. 1956

Od fungitoxických látek používaných v technické mikrobiologii se požaduje většinou účinek fungistatický; má být zabráněno růstu mikroorganismů, jimiž je výrobek kontaminován při výrobě nebo během užívání, někdy má být zabráněno přerůstání mikroorganismů z napadených předmětů na výrobek, který je s ním v kontaktu. K přesné definici vlastností fungitoxických látek je tedy nutno znát nejen jejich účinnost vůči mikroorganismům v suspensi, ale i vůči vegetativním formám mikroorganismů v populacích — v koloniích.

Pro první požadavek byly vypracovány dvě metody: předně zkouška fungistatické aktivity podle Schambergova a Kolmera (1922, cit. Reddish 1954), jejíž princip je v tom, že zkušebním organismem je inokulována Sabouraudova půda, obsahující různé koncentrace fungitoxických látek. Během 14 dnů inkubace se sleduje, zda dochází k růstu, nebo zda je růst trvale inhibován. Druhá metoda je u nás známa pod názvem difusní metoda nebo plotnová metoda podle Reddishe (1929, cit. Reddish 1954), kterou mimo jiné upravili Golden a Oster (1947), Kligman a Rosenweig (1948).

Pro požadavek druhý jsme z dostupné literatury zjistili pouze metodu, kterou vypracoval Falek (1907, cit. Reddish 1954): zkušební mikroorganismus byl kultivován na živné půdě s agarem, odkud byl vyříznut agarový bloček a přemístěn na živnou půdu s fungitoxickou látkou. Způsob preparace takovéto zkoušky byl však dosti obtížný, nehledě k tomu, že mycel (především jeho vegetativní část) byl při preparaci z kultury poškozován.

V tomto příspěvku je popsána metodika, již bylo užito ke stanovení fungistatické účinnosti některých látek ve smyslu druhého požadavku, to je přerůstání mikroorganismů z napadených předmětů na výrobek, který je s nimi v kontaktu.

Materiál a metody

Příprava sklíčkových kultur. Konidie plísně *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger* byly přeneseny do 0,1% vodního roztoku agaru. Suspense byla pipetována do ztekucené a na 45 °C zchlazené živné půdy podle Sabourauda s agarem (pepton 5,0 g, glukosa 40,0 g, agar 20,0 g, pH 5,5). Na sterilní krycí sklíčka (délka hrany 24 mm), umístěná na skleněné tyčince ve tvaru „U“ v Petriho misce, byla pipetou nanášena vrstva výše uvedené inokulované živné půdy. Kultivovali jsme při teplotě 30 °C, relativní vlhkost byla 95—100 %, kultivační doba 24 hod., 4 dny, 8 dnů a 12 dnů, jak je blíže uvedeno ve výsledcích.

Založení vlastního pokusu. Krycí sklíčko s dobře vyvinutou kulturou jsme přenesli pinsetou do Petriho misky o průměru 9 cm na utuhlou živnou půdu ztuženou agarem, obsahující určité množství fungitoxické látky, jinak téhož složení jako na krycím sklíčku. Sklíčková kultura byla položena sklíčkem na agar. Benzoan sodný a pentachlorfenolát sodný byly přidány do agaru ve vodném roztoku, jehož objem byl úměrný objemu suspence mikroorganismu pipetovaného do agaru, nanášeného na krycí sklíčka.

Inkubovali jsme při 30 °C po různou dobu: 24–48 hod., 4 dny, 8 dnů a 12 dnů. Jako kontrolní metody jsme použili Schambergovy a Kolmerovy metody (1922, cit. Reddish 1954) a metody plotnové.

Vyhodnocování pokusů. Pokusy byly vyhodnoceny dvojím způsobem. Mikroskopicky při rychlých, zejména orientačních zkouškách účinnosti fungitoxických látek, kdy jsme užili sklíčkové kultury plísní kultivované 24 hod. Odečítali jsme při 25–50násobném zvětšení po 24–48 hodinách inkubace. Použití 24hod. sklíčkové kultury bylo nutné proto, aby vegetativní mycelium se dobře vyvinulo, avšak aby vzdušné reprodukční mycelium nepřesahovalo okraj sklíčka a neznemožňovalo tak mikroskopickou kontrolu v bezprostředním jeho okolí.

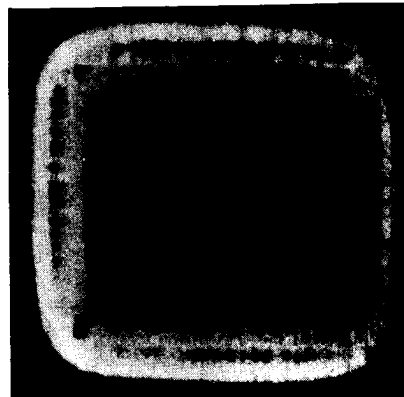
Makroskopicky pak v těch případech, kdy nedostačoval nález za 48 hod. a bylo nutno užít delší inkubační doby. Sledovali jsme, zda mikroorganismus přerůstá na živnou půdu s agarem; v pozitivních případech jsme měřili i šířku zony růstu v mm.

Výsledky

Zjišťovali jsme koncentraci benzoanu sodného a pentachlorfenolátu sodného, která inhibovala růst *A. flavus* a *A. niger*. Schambergovou a Kolmerovou metodou bylo prokázáno, že fungistatická aktivita benzoanu sodného vůči *A. flavus* a *A. niger* byla 1,3 %; ve zkouškách s plotnovou metodou (cylindříčky o průměru 8 mm) byly zjištěny pozitivní výsledky až při koncentracích nad 5 % vodného roztoku benzoanu sodného. Na obr. 1 a 2 je zachyceno přerůstání mycelu jako příklad mikroskopického zhodnocování popsaného testu po 24 hod. inkubace.

Jak je patrné z obrázku 1, při koncentraci 0,005 % pentachlorfenolátu sodného byl růst hyf ostře zastaven na styčné hranici s prostředím obsahujícím fungitoxickou látku. Naopak při koncentraci 0,002 % hyfy přerůstají ze sklíčkové kultury na půdu v Petriho misce (obr. 2). Na obrázku 3 je zachyceno makroskopicky patrné přerůstání mycelu při koncentraci 0,001 % pentachlorfenolátu sodného po 2 dnech inkubace; odečítání se provádí měřením celé růstové zony rovnoběžně s hranou sklíčka asi v polovině kolonie.

Sledovali jsme, do jaké míry ovlivňuje výsledky zkoušek stáří sklíčkové kultury a délka inkubační doby. V tabulce 1 jsou shrnuty výsledky získané při sledování inhibice růstu v různých koncentracích benzoanu sodného v živné půdě. Grafický průběh byl ve všech případech obdobný až do 8. dne inkubace. Během další inkubace se lišil u koncentrací 1,5 a 1,7 %. Příklad průběhu je uveden na obrázku 4. Z tabulky 1 je patrná závislost odolnosti mycelu na stáří kultury v tomto pořadí: největší odolnost (to je nejrychlejší růst) byla zjištěna u čtyřdenní sklíčkové kultury, dále následovala jednodenní, osmidenní, a dvanáctidenní kultura. Na základě těchto výsledků bylo tedy stanoveno, že pro rychlé zkoušky účinnosti fungitoxických látek zcela dostačí 24 hod. sklíčková kultura, i když citlivější je kultura čtyřdenní. Z uvedených křivek je patrné, že fungistatická účinnost benzoanu sodného, zjišťovaná popisovanou metodou, byla 1,9 % a byla tedy vyšší než koncentrace 1,3 %, stanovená Schambergovou-Kolmerovou metodou. Z hodnot uvedených v tabulce 1 je též patrné, že nejen u nižších koncentrací, ale částečně ještě i u koncentrace 1,7 % je průběh křivky nad 8 dnů ovlivňován rozměry misky, neboť při pozdějším odečítání



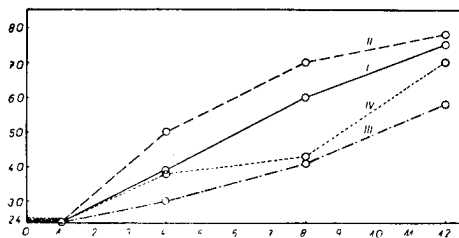
Obr. 3. Přerůstání mycelu *Aspergillus niger* ze sklíčkové kultury na půdu. Půda podle Sabourauda se 2 % agaru a 0,001 % pentachlorfenolátu sodného po 48 hod. inkubace. Zvětšeno 2 ×.

výsledků (po 12 dnech) u některých koncentrací bylo dosaženo maximálních rozměrů (80 mm) již dříve.

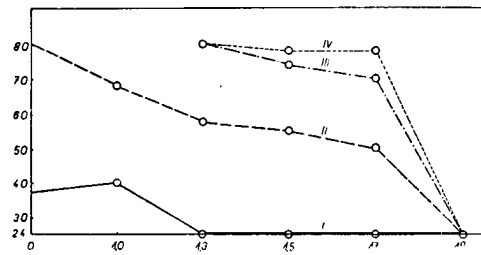
Tab. 1. Růst *Aspergillus flavus* v prostředí s různým obsahem benzoanu sodného

Stáří inokula ve dnech	Koncentrace benzoanu sodného v %						
	1,0	1,3	1,5	1,7	1,9	0	
Doba inkubace 24 hod.							
1	0	0	0	0	0	37 } Neodečítáno, rozsev spor ze sklíčkové kultury po celé ploše	
4	40	+	+	+	0		
8	+	+	0	0	0		
12	30	+	0	0	0		
Doba inkubace 4 dny							
1	53	51	44	39	0		
4	68	58	55	50	0		
8	54	45	41	30	0		
12	60	42	38	38	0		
Doba inkubace 8 dnů							
1	78	75	73	60	0		
4	80	80	74	70	0		
8	65	63	58	41	0		
12	80	55	50	43	0		
Doba inkubace 12 dnů							
1	80	80	80	75	0		
4	80	80	78	78	0		
8	80	80	80	58	0		
12	80	80	72	70	0		

Vysvětlivky: 0 — inhibice růstu,
+ — mikroskopicky patrné přerůstání mycelu,
číslo — rozměr zony růstu v mm.



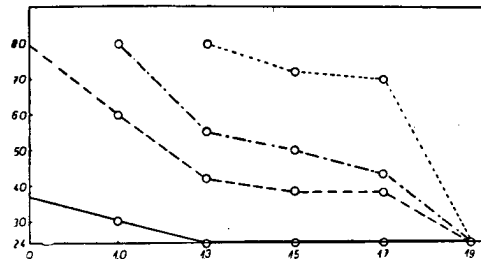
Obr. 4. Příklad průběhu rychlosti růstu různě staré sklíčkové kultury *Aspergillus flavus* v prostředí s 1,7 % benzoanu sodného. Osa x: počet dnů inkubace, osa y: průměr zony růstu v mm. Křivka I — stáří sklíčkové kultury — 24 hod. kultivace, II — 4 dny, III — 8 dnů, IV — 12 dnů.



Obr. 5. Znázornění změn rozměrů růstových zon 4 dny staré sklíčkové kultury *Aspergillus flavus*. Osa x: procento benzoanu sodného v půdě podle Sabourauda, osa y: průměr zony růstu. Křivka I — po 24 hod. inkubace, II — po 4 dnech, III — po 8 dnech, IV — po 12 dnech.

Nutno konstatovat, že absolutní výsledky zkoušek s delší inkubační lhůtou (4, 8 a 12 dnů) převážně odpovídají výsledkům získaným zkouškami za 48 hodin. Stejný nález byl i u *A. niger*.

Na obrázku 5 je patrné stimulační působení 1 % benzoanu sodného na čtyřdenní mycel, vzhledem ke kontrole, po 24 hod. inkubace. Stimulační účinek 1 % benzoanu sodného je možno snad vysvětlit tím, že největší růstovou aktivitu měla čtyřdenní sklíčková kultura. Zdá se tedy, že v případech, kde se pracuje s takovým množstvím fungitoxické látky, která jen slabě inhibuje růst mikroorganismů, rychlost růstu není zcela přesným ukazatelem pro určení citlivosti kultury. Rychlost růstu mikroorganismů při koncentracích jen slabě inhibujících má proto hodnotu pouze orientační. Absolutně platné jsou hodnoty negativního růstu. Z obrázků 5 a 6 je možno vyčíst, že inokulum staré 4 dny bylo ve svém růstu stimulováno pouze během počáteční fáze růstu, v dalším průběhu byla již rychlost růstu normální.



Obr. 6. Znárodnění růstových zon dvanáctidenní sklíčkové kultury *Aspergillus flavus*.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že za našich pokusných podmínek byla dostatečná čtyřdenní inkubace, při níž má metoda dostatečnou citlivost.

Diskuse

Srovnáme-li dosud užívané metody testování fungistatické účinnosti s metodou popisovanou, zjišťujeme, že u všech metod jsou výsledky stanovení závislé na správném výběru mikroorganismů, že však je zde rozdíl ve fyziologickém stavu mikroorganismů, neboť metody difusní a metoda Schambergova a Kolmerova užívají inokula, jež sestává ze směsi latentních a vegetativních buněk, kdežto naše metoda pracuje pouze s buňkami vegetativními. Autoři v jiných pokusech zjistili, že u plísni byly vegetativní orgány odolnější než jednotlivé buňky.

Počet zaočkovaných mikroorganismů může mít určitý význam u prvních dvou metod, u metody popisované je takový počet buněk, jaký odpovídá buněčné reprodukci užitého mikroorganismu za standardních kultivačních podmínek. U difusních metod závisí velikost zony na rychlosti difuze zkoušené sloučeniny prostředím a tato rychlost je poněkud ovlivněna obsahem vody v živném agaru a výškou agarové vrstvy. U všech zkoušek mohou rozdíly ve výšce agaru způsobit rozdíly v tensi kyslíku v prostředí. Rozdílné výsledky difusních metod jsou způsobovány též rozdílnou difusní rychlostí testovaných látek ve vztahu k jejich kvalitě i koncentraci, objemu testovaného roztoku a rozdíly v rozměrech cylindříků; dále jsou to rozdíly v časech aplikace testovaného roztoku a inokulací, závisí i na inkubační teplotě: čím je rychlejší růst mikroorganismů na misce, tím menší jsou zony a naopak. Doba inkubace má vliv na difuzi v tom smyslu, že dochází k snižování koncentrace a k zmenšování zony. U všech popisovaných metod může doba inkubace měnit nálezy proto, že dochází k pozměněným podmínkám vztahů mezi pokusným mikroorganismem a fungitoxickou látkou: může docházet k částečné adaptaci mikroorganismů na fungitoxickou sloučeninu (detoxikace, asimilace, změna metabolismu), nebo se může měnit koncentrace látky v důsledku sublimace nebo destrukce.

Z uvedených výsledků lze soudit, že v těch případech, kde je žádoucí přesně stanovit fungistatickou koncentraci preparátů pro jednotlivé mikrobiální buňky je přesnou metodou metoda podle Schambergova-Kolmera. Vzhledem k tomu, že mikroorganismy téměř vždy rostou v populacích, je nutno tyto zkoušky doplnit popisovanou metodou. Užívání metody difusní má své opodstatnění pouze v těch případech, kde se zkouší kvalita jedné a vždy téže látky, čímž rozumíme sloučeninu stejné chemické konstituce i složení. Difusní metody nemůže být použito ke stanovení fungistatických koncentrací.

Předností popisované metody je možnost sledovat citlivost různých starých kultur mikroorganismů proti fungitoxickým sloučeninám i po delší dobu, aniž by byly výrazně změněny základní podmínky zkoušky. Sledování působení těchto látek na mikroorganismy po delší dobu je dobrým napodobením podmínek praxe.

Tento způsob testování je vhodný i pro bakterie a kvasinky, kde však často dochází k nerovnoměrnému růstu vlivem kondenzační vody a jiných faktorů.

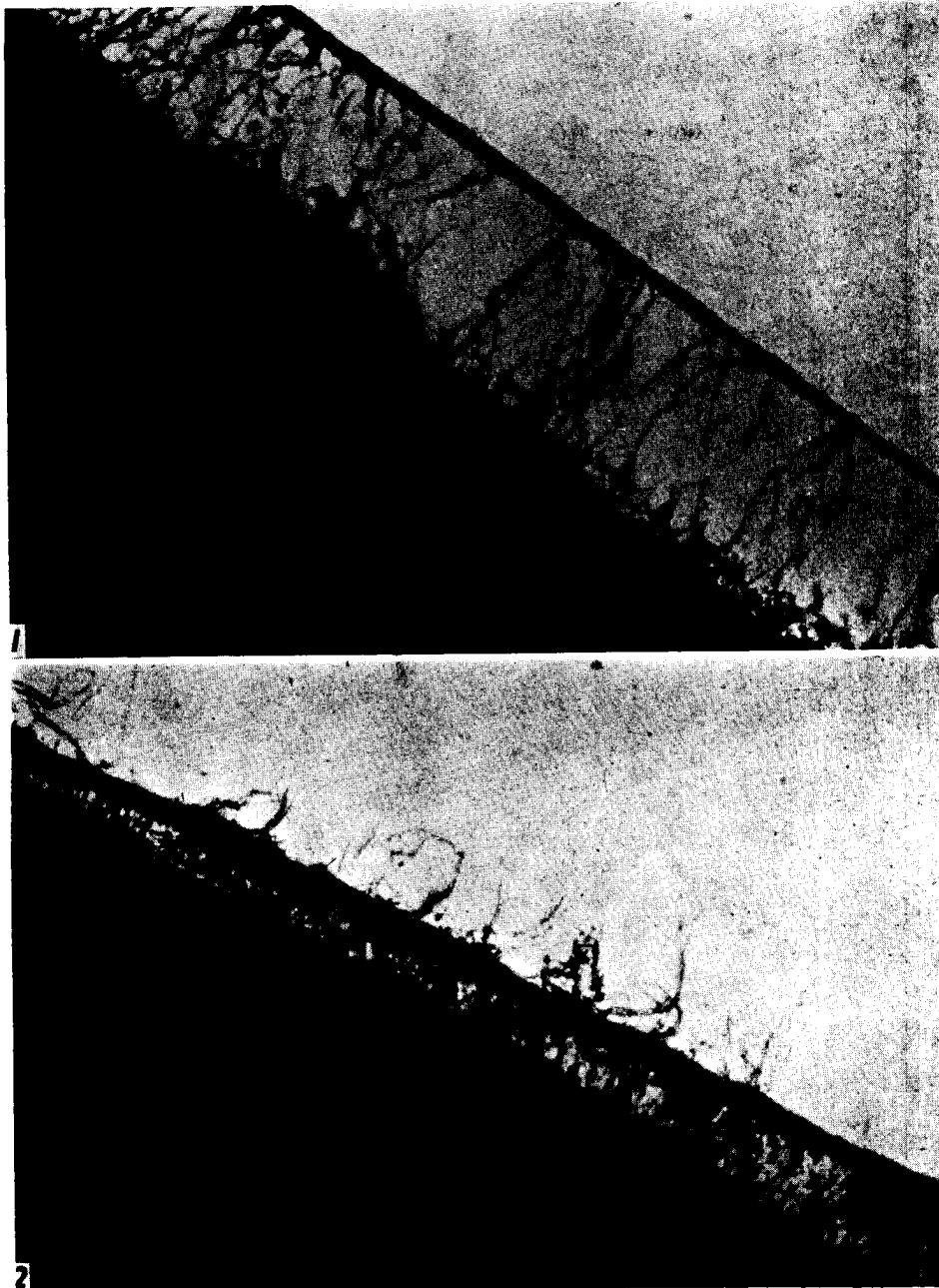
Souhrn

Vypracovali jsme metodu, jíž lze zjistit minimální koncentrace fungitoxických látek, inhibujících růst vegetativních forem mikroorganismů v kultuře. Zkušební mikroorganismus byl předběžně kultivován na příslušné živné půdě s agarem, nanesené na krycím sklíčku. Umístěním kultury vyrostlé na krycím sklíčku do Petriho misky do prostředí živné půdy s agarem a určitým obsahem fungitoxické sloučeniny, lze pak stanovit účinnou koncentraci. Odečítá se buď mikroskopicky při rychlých zkouškách nebo makroskopicky, kdy se zkouší vliv fungitoxických látek na starší mycelium a též tam, kde nedostačuje mikroskopický nálezní za 48 hodin. Při případných zkouškách bakteriostatické účinnosti se odečítá makroskopicky. Výsledky získané touto metodou jsou stejně přesné jako výsledky získané Schambergovou a Kolmerovou metodou. Vzhledem k tomu, že vegetativní formy mikroorganismů v kultuře jsou odolnější, je užívání této metody zcela opodstatněné.

Za technickou spolupráci děkuji D. Herynkové a H. Lebedové.

L i t e r a t u r a

- Golden, M. J., Oster, K. A.: *Evaluation of fungistatic laboratory test methods*. J. Am. Pharm. Assoc. 36 : 283, 1947.
- Kligman, A. M., Rosenweig, W.: *Simple quantitative method for the laboratory assay of fungicides*. J. Invest. Dermatol. 10 : 51, 1948.
- Reddish, G. F.: *Antiseptics, disinfectants, fungicides, and chemical and physical sterilization*. Lea and Febiger, Philadelphia 1954.
- Lees, K. A. Tootill, J. R. P.: *Microbiological assay on large plates*. The Analyst 947 : 95, 1955.



Obr. 1. Mikroskopický obraz inhibice růstu *Aspergillus niger*. Půda podle Sabourauda se 2 % agaru a 0,005 % pentachlorfenolátu sodného. — Zvětšeno 45 ×.

Obr. 2. Mikroskopický obraz slabé inhibice růstu *Aspergillus niger*. Půda podle Sabourauda se 2 % agaru a 0,002 % pentachlorfenolátu sodného. — Zvětšeno 45 ×.

К вопросу определения фунгитоксической эффективности фунгитоксических соединений

Испытания фунгитоксической активности подавления вегетативных форм микроорганизмов в культурах

М. Бомар

Резюме

Был разработан метод определения минимальных концентраций фунгитоксических веществ, подавляющих рост вегетативных форм микроорганизмов в культуре. Тест-микроб выращивался предварительно на соответственном питательном агаре на покровном стеклышке. Помещая культуру, выращенную на покровном стеклышке, в питательный агар с определенным содержанием фунгитоксического вещества в чашку Петри, можно определить эффективную концентрацию. Оценка производится или микроскопически — при быстрых пробах эффективности концентраций, или макроскопически, — когда исследуется влияние фунгитоксических веществ на старый мицелий или там, где микроскопического исследования через 48 час. оказывается недостаточно. Если испытывается бактериостатическое действие, производится макроскопическая оценка. Получаемые с помощью этого метода результаты не менее точны, чем результаты, которые дает метод Schamberg-Kolmer-a. Ввиду того, что вегетативные формы микроорганизмов в культуре более устойчивы, применение этого метода имеет все основания.

Notes on the Determination of the Fungistatic Effect of Fungitoxic Compounds

Tests of Fungistatic Activity Inhibiting Vegetative Forms in Populations of Micro-organisms

M. Bomar

Summary

A method was elaborated for determining the minimum concentrations of fungitoxic substances which inhibit the growth of vegetative forms of micro-organisms in a culture. The test micro-organism is first cultured on the appropriate nutrient agar on a cover slide. The effective concentration of the fungistatic compound is determined by placing the culture grown on the cover slide in a Petri dish in a medium of nutrient agar containing a given amount of the compound. The results are either read off microscopically, in rapid tests of the effective concentrations, or macroscopically, by testing the effect of the fungitoxic substance on older mycelium and also in cases where the microscopic findings after 48 hours are not sufficient. The results of tests of bacteriostatic action are read off macroscopically. The results obtained by this method are just as accurate as those obtained by the Schamberg-Kolmer method. With reference to the greater resistance of vegetative forms of micro-organisms in a culture, the use of this method is fully justified.

Československá
M I K R O B I O L O G I E
ročník 2. (1957) — č. 4

Vliv jedlového porostu na biologický stav půdy

JAROMÍR SEIFERT

Oddělení půdní mikrobiologie, Biologická fakulta Karlovy university, Praha

Došlo 27. 2. 1957

Biologický stav půdy souvisí s její nejdůležitější vlastností, s půdní úrodností. Proto má zjištění biologického stavu lesních půd základní význam při geobotanickém ohodnocení stanoviště, při posouzení produkční možnosti půdy nebo při stanovení vhodnosti pěstebního nebo těžebního zásahu (Seifert 1949, 1950). Biologická složka půdy reaguje velmi citlivě na všechny vlivy, a to již v době, kdy nejsou postihnutelné chemickými nebo fyzikálními metodami.

V předložené práci se zabýváme studiem otázky, jaké změny v biologickém stavu půdy působí jedlový porost, který nalétl do prořídleho smrkového porostu.

Materiál a metody

Pozorování jsme konali na dvou lokalitách v polesí Bolehošť (Výzkumný ústav lesního hospodářství, Opočno). První lokalita je na úpatí Křiviny, druhá lokalita v prostoru Jírovství. Nadmořská výška obou lokalit je asi 300 m. Půda je středně hluboká, podklad opuka. Roční množství srážek činí 650 mm, roční teplotní průměr je 7,5 °C.

Lokalita Křivina. Původní porost bez zápoje je v páté věkové třídě. Převažuje smrk, vtroušena jedle, ojediněle modřín. V podrostu je *Calamagrostis epigeos*, *Fragaria vesca*, *Veronica officinalis*, *Carex* sp., *Epilobium montanum*. Vrstva humusu 5 cm. Nezapojená jedle má výšku kolem 3 m. Půda je bez bylinného pokryvu. Hrabanka poměrně málo rozložena. Humus (0–3 cm) se špatně mísí s minerálním spodkem. Zapojedná jedle tvoří skupinku o průměru 15 m. Výška stromů je asi 4 m. Bylinné patro chybí. Humusová vrstva je 1 cm mocná. Humus v dobrém stavu mineralisace se dobře mísí s minerálním spodkem.

Lokalita Jírovství. Původní porost smrku je v páté věkové třídě. Bylinné patro zde chybí. Humus, ostře oddělený od minerálního spodku, zde tvoří vrstvu 3–4 cm. Jedlový porost tvoří skupinky o průměru 8–10 m. Výška stromů je 3–4 m. Humus (3–4 cm) se dobře mísí s minerálním spodkem. Bylinné patro chybí.

Pro posouzení biologického stavu půdy jsme stanovili nitrifikaci, amoniaci a biologickou aktivitu. Stanovení byla provedena s půdou na vzduchu vyschlou, prosátou 2 mm sítí a inkubovanou s obsahem vody, který odpovídá 60 % plné vodní kapacity. Obsah dusičnanů při nitrifikaci byl stanoven pomocí fenoldisulfonové kyseliny, množství amoniaku při amoniaci titračně ve výluhu roztokem chloridu draselného způsobem uvedeným v Praktiku fytoecologie, ekologie, klimatologie a půdoznalství (Klika, Novák a Gregor 1954). Doba inkubace byla v obou případech 14 dní. Biologická aktivita byla stanovena titrací kyslíčnicku uhlíčitého absorbovaného v roztoku louhu sodného (Bernát a Seifert 1955). Dále jsme provedli stanovení bacilů na masopeptonovém agaru a základní stanovení rozkladačů celulosy na Vinogradského křemícitém gélu. Rozklad celulosy byl zjištěn proužkovou metodou (Klika a sp. 1954). Tato stanovení byla doplněna zjištěním obsahu uhlíku, dusíku a pH.

Výsledky a diskuse

Výsledky své studie jsme shrnuli do dvou tabulek a dvou obrázků. Z těchto vyplývá, že na obou lokalitách došlo pod jedlovým porostem ke značným změnám

biologického stavu půdy. Pod zapojeným porostem jedle se podstatně zlepšily procesy souvisící s mineralisací dusíku. Výrazné je zejména zlepšení stavu nitrifikace. Vzhledem k tomu, že intenzita nitrifikace je ukazovatelem celkové mineralisace

Tab. 1. Výsledky stanovení biologického stavu půdy na lokalitě Křivina
Počet bacilů je uveden v tisících na 1 g suché půdy

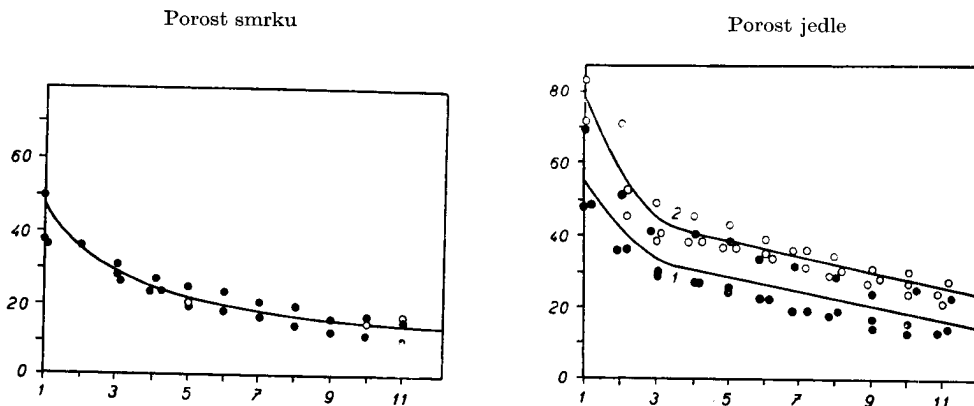
	Porost smrku (<i>Picea excelsa</i>)			Nezapojená jedle (<i>Abies alba</i>)			Zapojená jedle (<i>Abies alba</i>)		
	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.
Obsah uhlíku (C %)	8,7	12,9	12,6	17,4	15,3	19,5	11,7	16,2	11,7
Obsah dusíku (N %)	0,42	0,75	0,84	1,4	1,28	1,68	0,95	1,42	1,02
C : N	19	17,2	14,8	12,4	12	11,6	12,4	11,4	11,9
pH	5,3	4,6	4,9	5,1	5,3	5,0	5,4	5,3	5,5
Amonisace mg/kg	100	110	140	150	260	230	140	210	100
Nitrifikace mg/kg	2	9	7	4	3	5	12	22	16
<i>Bac. cereus</i>	49	10	17	50	6	30	22	37	28
<i>Bac. myocides</i>	10	2	11	3	1	4	2	10	4
<i>Bac. mesentericus</i>	5	12	10	—	6	2	1	2	1
<i>Bac. megatherium</i>	23	10	15	12	17	16	31	31	33
<i>Bac. idosus</i>	2	1	7	—	—	—	1	3	4
Rozkladači celulosy:									
<i>Cytophaga silv.</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Fungi</i>	+++	+	++	—	—	—	++	+++	+++

Tab. 2. Výsledky stanovení biologického stavu půdy na lokalitě Jírovství
Počet bacilů je uveden v tisících na 1 g suché půdy
V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty za 3 roky pozorování

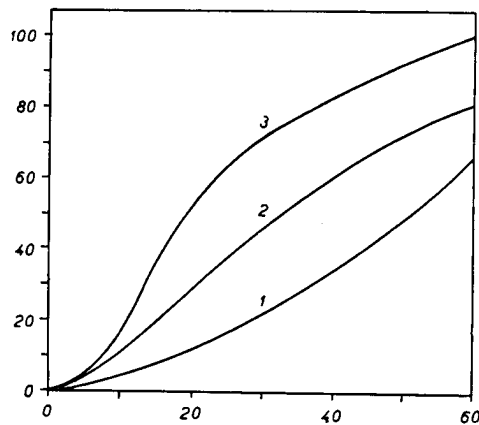
	Porost smrku (<i>Picea excelsa</i>)	Porost jedle (<i>Abies alba</i>)	
		I.	II.
Obsah uhlíku (C %)	10	4,91	4,15
Obsah dusíku (N %)	0,44	0,33	0,36
C : N	23	15	12
Amonisace mg/kg	45	60	58
Nitrifikace mg/kg	+	30	20
<i>Bac. cereus</i>	75	100	120
<i>Bac. myocides</i>	10	23	25
<i>Bac. mesentericus</i>	17	10	12
<i>Bac. megatherium</i>	20	130	118
<i>Bac. idosus</i>	5	1	3
Rozkladači celulosy:			
<i>Cytophaga silv.</i>	—	+	++
<i>Fungi</i>	+++	+	+

(Mišustin 1956), můžeme říci, že v půdě pod zapojeným porostem se značně zlepšila celková mineralisace a tím i výživa stromů. Nezapojený porost jedle nevykazuje tak velké zlepšení. Nitrifikace je zde v průměru dokonce nižší než pod smrkovým

porostem. Určité zlepšení můžeme pozorovat při amoniaci a rozkladu celulosy. Pozoruhodné je však to, že biologická aktivita nezapojeného porostu je podstatně vyšší než u porostu zapojeného. Z ostatních ukazatelů potvrzuje zlepšení stavu půdy pod jedlovým porostem snížený poměr uhlíku a dusíku, který můžeme pozorovat ve všech případech. V celku můžeme hodnotit působení jedlového porostu na půdy bývalých smrčín příznivě a v uvedených podmínkách doporučit jedli jako meliorační dřevinu.



Obr. 1. Biologická aktivita půdy studovaných ploch na lokalitě Křivina. Výsledky stanovení tří odběrů. Černé body (křivka 1) značí porost zapojený, bílé body (křivka 2) porost nezapojený. Osa x: čas ve dnech, osa y: mg CO₂.



Obr. 2. Rozklad celulosy z lokality Křivina. 1 — původní porost smrku, 2 — nezapojený porost jedle, 3 — zapojený porost jedle. Osa x: čas ve dnech, osa y: procenta rozkladu celulosy

Souhrn

Na základě porovnání intenzity nitrifikace, amoniaci, rozkladu celulosy a biologické aktivity jsme zjistili, že jedlový porost působí příznivě na biologický stav půd bývalých smrčín. Při tom působí zapojený porost příznivěji než porost nezapojený.

L i t e r a t u r a

- Bernát, J., Seifert, J.: *Biologická aktivita půd*. Biológia 10 : 285, 1955.
Klika, J., Novák, V., Gregor, A.: *Praktikum fytoecologie, ekologie, klimatologie a půdoznalství*. Praha 1954.
Mišustin, E. N.: *Učebnice o mikrobiálních asociacích a jevo rozvíjení*. Doklady k VI. mezinárodnímu kongresu počvovědov. AN SSSR 1956.
Seifert, J.: *Amonisace a nitrifikace půd křivoklátských lesů*. Sborník Masarykovy akademie práce 23 : 364, 1949.
Seifert, J.: *Půdně biologická studie lesních společenstev ve Velké Fatře*. Lesnická práce 29 (9—12) : 343, 1950.

Влияние поросли пихты (*Abies alba*) на биологическое состояние почвы

Я. Зайферт

Резюме

Биологическое состояние почвы соотнесено с важнейшим ее свойством — с ее плодородием. Поэтому определение биологического состояния почвы имеет существенное значение при геоботанической оценке места произрастания, как и при оценке производственных возможностей почвы и уместности вмешательства по насаждению или эксплуатации.

Биологический фактор почвы очень чувствительно реагирует на все влияния и регистрирует их уже в то время, когда их еще невозможно отметить с помощью химических или физических методов.

В настоящей работе мы исследовали вопрос, какие изменения биологического состояния почвы вызывает 20-летняя поросль пихты, возникшая самосевом в прореженном 80—100-летнем еловом покрове. Исследования производились на 2 местах полевья Болегошь в восточной Чехии. Получены следующие результаты: пихтовый покров действует на биологическое состояние почвы положительно. После смыкания крон улучшение выразительнее, чем до него. Смыкание крон улучшает прежде всего нитрификацию. Так как нитрификация, по Мишустину (1956), одновременно является показателем минерализирующей способности почвы, то можно сказать, что пихтовый покров улучшает общее плодородие почвы.

The Influence of Silver Fir Stand (*Abies alba*) on the Biological State of the Soil

J. Seifert

Summary

The biological state of the soil is associated with its most important property, i. e. fertility. The determination of the biological state of the soil is therefore of basic importance when making a geobotanical evaluation of a given area, assessing the production possibilities of the soil or determining a suitable type of cultivation or exploitation. The biological composition of the soil is very sensitive to all kinds of influences and registers their effect when they cannot yet be detected by chemical or physical methods. The communication deals with the question of the changes produced in the biological state of the soil by 20-year-old silver fir stand sown by the wind among thin spruce stand from 80—100 years old. Two localities in Eastern Bohemia were studied. The results are as follows: Closed silver fir stand has a favourable effect on the biological state of the soil. Closed stand produces greater improvement than stand with open crown closure. Silver fir stand with closed crowns has a favourable influence mainly on nitrification. Since according to Mishustin (1956), nitrification is likewise an indicator of the mineralization capacity of the soil, it may be said that silver fir stand also improves the general fertility of the soil.

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

ročník 2. (1957) — č. 4

Orientační stanovení iontového charakteru antibiotik plotnovými testy

VLADIMÍR ŠEVČÍK a MILOSLAV PODOJIL

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 19. 12. 1956

Důležitým znakem pro identifikaci neznámých antibiotik je jejich iontová povaha. Stanovení tohoto znaku elektroforesou je poměrně zdlouhavé. Proto jsme vypracovali metodiku stanovení iontového charakteru neznámých antibiotik testováním na plotnách, obsahujících agarovou vrstvu s jemně zrnitým měničem iontů.

Materiál a metody

Příprava vzorků. Při testování jsme použili agarových bločků o průměru 8 mm s roztoky antibiotik v živné půdě (glukosa 1 %; škrob 1,5 %, kukuřičný extrakt suchý 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,35 %; NaCl 0,5 %; CaCO_3 0,5 %) a agarových bločků s vyrostlými aktinomycetami po kultivaci 3–5 dnů při 28 °C na agarové půdě téhož složení. Bližší označení standardů je uvedeno v předchozí práci (Ševčík, Podojil a Vrtišková 1957).

Příprava agarových ploten. Orientační stanovení iontového charakteru antibiotik provádíme na velkých skleněných misách 35 cm × 35 cm s modifikovanou agarovou půdou pro difusní titrace penicilinu (Ševčík 1954): masová voda 1000 ml, agar 20 g pro základní vrstvu nebo 10 g pro povrchovou vrstvu; pH upraveno na 6,8–7,0; pepton a chlorid sodný do půdy nepřidáváme, neboť snižují výměnnou kapacitu měničů aniontů.

Na skleněnou misu rozléváme nejdříve 400 ml rozehráté sterilní základní agarové půdy. Po rozlití a utužení základní agarové půdy klademe agarové bločky s antibiotiky nebo s vyrostlými aktinomycetami do otvorů o průměru 8 mm vyříznutých korkovrtem. Od každého vzorku dáváme po 5 agarových bločcích na obě poloviny mísy (celkem 10 vzorků na jednu misu). Po rozdělení mísy na polovinu tuhým papírem přelejeme základní agar v kontrolní polovině 150 ml 2% agaru bez měniče iontů a v druhé polovině stejným množstvím 2% agaru s měničem iontů. Po utužení středních vrstev vyjmeeme tuhý papír a misu přelejeme 100 ml povrchové agarové půdy se zaočkováním testovacím mikroorganismem *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Ševčík 1954). Mísy inkubujeme 18 hod. v termostatu při 37 °C. Hodnotíme srovnávaním průměrů inhibičních zon získaných na půdě s měničem iontů s průměry inhibičních zon získaných v kontrolní části bez měniče iontů.

Měníče iontů. Měníče kationtů ROA (Severa, Pecák a Hoffman 1954) o velikosti zrn méně než 0,06 mm používáme v Na-cyklu jako 1% suspence (suché váhy) v agarové půdě. (Preparát byl připraven ve Výzkumném ústavu syntetických pryskyřic v Pardubicích). Jako měniče aniontů byly vyzkoušeny Fluka STG (A. G. St. Gallen), Amberlite IRA-400 (Rohm a Haas), Amberlite IR-4B (Rohm a Haas), Wofatit L (NDR), středně basický měnič aniontů MFD (Stalinovy závody, n. p.) a silně basický měnič aniontů OAL (Stalinovy závody, n. p.). Uvedených měničů aniontů bylo použito v Cl-cyklu jako 20% suspence (vlhké váhy) v agarové půdě. Z měničů aniontů se osvědčil pouze měnič Fluka STG v Cl-cyklu.

Měníče aniontů přidáváme do rozehráté agarové půdy až po sterilisaci; přidáme-li totiž měnič aniontů do agarové půdy před sterilisací, testovací mikroorganismus vůbec nevyroste. Sterilisací se z měniče aniontů uvolňují zřejmě různé látky inhibující růst testovacího mikroorganismu. Podobný zjev nebyl pozorován u měniče kationtů. Vzhledem k jednodušší přípravě přidáváme proto měnič kationtů do agarové půdy již před sterilisací.

Výsledky a diskuse

Výsledky orientačního stanovení iontového charakteru plotnovými testy u známých antibiotik jsou uvedeny v tabulce 1 a 2. Na agarové půdě s měničem kationtů je zřetelné zmenšení inhibičních zon u antibiotik zásaditého, případně amfoterního

Tab. 1. Plotnové testy s měničem kationtů ROA v Na-cyklu a s měničem aniontů Fluka STG v Cl-cyklu
Agarové bločky s roztoky antibiotik. Velikost inhibičních zon je uvedena v mm a každý údaj je průměrem z 10 hodnot

Antibiotikum; iontový charakter	Střední agarová vrstva s měničem kationtů		Střední agarová vrstva s měničem aniontů	
	bez měniče iontů	s měničem iontů	bez měniče iontů	s měničem iontů
Streptomycin; zásaditý (Waksman a Schatz 1945)	25,6	0	22	20,1
Viomycin; zásaditý (Haskell a sp. 1952)	20,7	0	19,9	15
Neomycin; zásaditý (Waksman a Lechevalier 1949)	19	9,4	20	15,1
Chlortetracyklin; amfoterní (Van Dyck a De Somer 1952)	38,6	13,6	22	18,2
Oxytetracyklin; amfoterní (Regna a Solomons 1950)	39	10,2	24,6	22,5
Aktinomycin B (105/5); slabě zásaditý (Waksman 1954)	25,5	17,2	21,3	21,2
Aktinomycin 154; slabě zásaditý (Waksman 1954)	28,4	17,7	20,2	20
D-chloramfenikol; neutrální (Bartz 1948)	33,9	32,6	28,7	16,5
Penicilin; kyselý (Fleming 1946)	24,9	25,5	31,5	0

Tab. 2. Plotnové testy s měničem kationtů ROA v Na-cyklu a s měničem aniontů Fluka STG v Cl-cyklu
Agarové bločky s vyrostlými aktinomycetami. Velikost inhibičních zon je uvedena v mm a každý údaj je průměrem z 10 hodnot

Produkce aktinomyceta (antibiotikum)	Střední agarová vrstva s měničem kationtů		Střední agarová vrstva s měničem aniontů	
	bez měniče iontů	s měničem iontů	bez měniče iontů	s měničem iontů
<i>Streptomyces griseus</i> (streptomycin)	32,7	0	23,7	22
<i>Str. aureofaciens</i> (chlortetracyklin)	34	10,1	24,4	20,1
<i>Str. rimosus</i> (oxytetracyklin)	33,4	7	24,7	23,1
<i>Streptomyces</i> čís. 105/5 (aktinomycin B)	26,1	14,9	24,1	24
<i>Streptomyces</i> čís. 154 (aktinomycin 154)	28,6	22,4	29,1	28,9

характеру, zatím co u antibiotika neutrálního charakteru (D-chloramfenikol) a u antibiotika kyselého charakteru (penicilin) zmenšení inhibičních zon nepozorujeme.

Na půdě s měničem aniontů nebyla u penicilinu pozorována žádná inhibiční zóna, i když u kontroly byla inhibiční zóna poměrně velká. Částečné zmenšení inhibičních zon na půdě s měničem aniontů bylo pozorováno též u antibiotik, jež nemají kyselý charakter.

U měniče kationtů jde převážně o výměnu iontů, takže zmenšení velikosti inhibičních zon pozorujeme pouze u antibiotik zásaditého nebo amfoterního charakteru. U měničů aniontů se však vedle výměny aniontů uplatňuje do značné míry též adsorpce (Šmíd a sp. 1954), čímž můžeme vysvětlit částečné zmenšení inhibičních zon i u antibiotik, jež nemají kyselý charakter.

Souhrn

Byla vypracována metodika orientačního stanovení iontového charakteru neznámých antibiotik testováním na plotnách, obsahujících agarovou vrstvu s jemně zrnitým měničem iontů. Jako měniče kationtů používáme preparátu ROA. Z měničů aniontů se osvědčil preparát Fluka STG.

Literatura

- Bartz, Q. R.: *Isolation and characterization of chloromycetin*. J. Biol. Chem. 172 : 445, 1948.
Fleming, A.: *Penicillin*. London 1946.
Haskell, T. H., Fusari, S. A., Frohardt, R. P., Bartz, Q. R.: *The chemistry of viomycin*. J. Am. Chem. Soc. 74 : 599, 1952.
Regna, P. P., Solomons, I. A.: *The chemical and physical properties of terramycin*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 53 : 229, 1950.
Severa, Z., Pecák, V., Hoffman, J.: *Průmyslová izolace látek na měničích iontů*. Chemický průmysl 4 : 223, 1954.
Ševčík, V.: *Úvod do biochemické analýsy mikroorganismů*. NČSAV, Praha 1954.
Ševčík, V., Podojil, M., Vrtišková, A.: *Použití papírové chromatografie při výzkumu nových antibiotik*. Čs. mikrobiol. 2 : 175, 1957.
Šmíd, J a kolektiv: *Měníče iontů, jejich vlastnosti a použití*. SNTL, Praha 1954.
Van Dyck, P., De Somer, P.: *Production and extraction methods of aureomycin*. Antib. Chemother. 2 : 184, 1952.
Waksman, S. A.: *Actinomycin. I. Historical-nature and cytostatic action*. Antib. Chemother. 4 : 502, 1954.
Waksman, S. A., Lechevalier, H. A.: *Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms*. Science 109 : 305, 1949.
Waksman, S. A., Schatz, A.: *Streptomycin—origin, nature, and properties*. J. Am. Pharm. Assoc. 34 : 273, 1945.

Ориентировочное определение ионного характера антибиотиков с помощью тестов на пластинках агара

В. Шевчик и М. Подоил

Резюме

Была разработана методика ориентировочного определения с помощью тестов на агаре ионного характера неизвестных антибиотиков. В основную среду с агаром мы вкладываем блоки агара с разросшимися актиномицетами и заливаем средой с агаром и катионообменным адсорбентом ROA или с анионообменным адсорбентом Fluka STG. Пластинку агара с ионоизменителем мы заливаем сверху слоем среды с агаром, зараженной микробом. Оценку мы производим сравнивая диаметры зон угнетения после 18-часовой инкубации при 37 °C в среде с ионоизменителем — с диаметрами зон угнетения в контрольной части пластинки, без ионоизменителя. Несмотря на то, что эта методика менее точна, чем обычно применяющийся бумажный электрофорез, она по своей простоте и скорости удобна для первых избирательных проб.

A Test for Determining the Ionic Character of Antibiotics by means of Agar Plates

V. Ševčík and M. Podojil

S u m m a r y

A test was elaborated for determining the ionic character of unknown antibiotics by means of agar plates. Agar blocks with mature actinomycetes are placed in the basic agar medium, over which an agar medium containing cation exchange resin ROA or Fluka STG anion exchange resin is poured. Agar medium inoculated with a micro-organism is then poured over the agar medium containing ion exchange resin. The results are evaluated by comparing the averages of inhibition zones obtained after 18 hours' incubation at 37° C in the medium containing ion exchange resin and the averages of inhibition zones in the control part of the plate containing no ion exchange resin. Although this method is less exact than paper electrophoresis, it is satisfactory for use in the first selective tests because of its simplicity and quickness.

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

ročník 2. (1957) — č. 4

Pronikání antibiotik dialyzační membránou na agarových plotnách

VLADIMÍR ŠEVČÍK a ALENA VRTIŠKOVÁ

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 5. 12. 1956

Schopnost antibiotik pronikat v těle živočichů je velmi důležitá pro posouzení jejich účinnosti in vivo. Prvé údaje o této vlastnosti nám poskytuje modelový pokus,

Tab. 1. Velikost inhičních zón v mm při dialyze antibiotik rozpuštěných v agarových bločcích.
Titrační půda pro streptomycin

Půda (agarový bloček)	Doba dialyzy (difuze) v hod.								
	1		2		4		6		18
	A	B	A	B	A	B	A	B	K
	Streptomycin 100 µg/ml								
S ₁	18,5	15	18	15	18,5	16	18	16,5	20
PŠ	18,5	15	19	16,5	20	17,5	19,5	18	21
S ₀	17,5	14	17	15	18	15,5	18	16,5	20
P ₀	18	14	17	17	17	15,5	17,5	16	20
	Viomycin 100 µg/ml								
S ₁	9,5	4	9,5	6	10,5	8	9	6	13,5
PŠ	10,5	6,5	11	8	11,5	8	11,5	10	14,5
S ₀	11,5	6,5	11,5	6,5	11,5	7	9,5	6,5	15
P ₀	12,5	7,5	11,5	7	10,5	7	9	5	14
	Viomycin 500 µg/ml								
S ₁	12	10	13,5	11	13	10	13	11	14
PŠ	13,5	10	13,5	11,5	13,5	12,5	13,5	12,5	15
S ₀	14,5	12	15	12	14,5	12,5	14	12,5	15,5
P ₀	12,5	9,5	13	9,5	11	9	10,5	9	12,5
	Neomycin 500 µg/ml								
S ₁	14	11	14	12,5	14,5	13	14	13	14
PŠ	14	12	14,5	13	14,5	14	15,5	14	15
S ₀	14	11,5	14,5	12	14,5	13,5	15,5	13,5	15
P ₀	12	8,5	12	9,5	12,5	11	12	10	12
	Erythromycin 30 µg/ml								
S ₁	10,5	6	12	6	14,5	11	15,5	12,5	17,5
PŠ	11	6	13	7	15	12,5	16	14	17,5
S ₀	7,5	5	9	5	17	7	13	10,5	16
P ₀	8,5	5	11	5	13,5	8,5	14	12	16

A — agarový bloček bez membrány (difuze).

B — agarový bloček s membránou (dialyza).

K — agarový bloček ponechán na agarové plotně do příštího dne.

kterým stanovíme pronikání antibiotik celofánovou membránou. Abychom tyto poznatky mohli získat již v době, kdy máme produkční aktinomycetu na agarových plotnách, vypracovali jsme jednoduchou testovací metodu. Použití uvedené plotnové metody má sice určité omezení, avšak vzhledem k možnosti zpracovat v krátké době poměrně velký počet produkčních kmenů je tato metoda vhodná jako jeden z prvních výběrových testů při hledání nových antibiotik.

Materiál a metody

Příprava vzorků. Při testování schopnosti antibiotik pronikat dialyzační membránou jsme použili agarových bločků o průměru 6 mm s roztoky antibiotik v různých živných půdách a agarových bločků s vyrostlými aktinomycetami po kultivaci 5 nebo 23 dnů při 28 °C na půdě S₁. Bližší označení standardů antibiotik a složení agarových půd je uvedeno v předchozí práci (Ševčík, Podojil a Vrtišková 1957).

Tab. 2. Velikost inhibičních zón v mm při dialyze antibiotik rozpuštěných v agarových bločcích. Titrační půda pro chlortetracyklin

Půda (agarový bloček)	Doba dialyzy (difuze) v hod.								
	1		2		4		6		18
	A	B	A	B	A	B	A	B	K
	Chloramfenikol 100 µg/ml								
S ₁	26	22,5	28	25,5	29	27,5	30	29	30,5
PŠ	28	24	29	27	30	29	31	29	31
S ₀	27	25,5	30	27	31,5	30	32	30,5	31,5
P ₀	24	23	27	25	28,5	26,5	29	28,5	29,5
	Aktinomycin B 50 µg/ml								
S ₁	19,5	0	20	11,5	21	17	21	17,5	21,5
PŠ	18	0	19	10,5	20	14,5	20,5	16	20
S ₀	20	0	21	13,5	22	15,5	21,5	18	21,5
P ₀	20	0	20,5	20	21	16	21,5	16,5	22
	Chlortetracyklin 100 µg/ml								
S ₁	20,5	16,5	26,5	22	27	22	26	23,5	27
PŠ	23	15,5	24	18,5	26	21	25	22	26
S ₀	27	19,5	28	22	28,5	24,5	29	25	28
P ₀	25,5	18	26	21,5	26	23	26,5	24	27,5
	Oxytetracyklin 25 µg/ml								
S ₁	17	7	19	11	19,5	15,5	20	17	20,5
PŠ	12	6	15	9	18,5	10,5	18	14,5	18
S ₀	16	6	19,5	14	20,5	17,5	22	18	21,5
P ₀	16	7	19	12,5	20,5	17,5	22	19	21
	Oxytetracyklin 100 µg/ml								
S ₁	22,5	11	24	17	25	22	26	22	26
PŠ	20	8	23	15,5	24	20	25	20,5	24,5
S ₀	23	17	24,5	22	26	24	27,5	24	27
P ₀	23,5	18	25	25	26	22	26,5	23,5	26,5

A – agarový bloček bez membrány (difuze).

B – agarový bloček s membránou (dialyza).

K – agarový bloček ponechán na agarové plotně do příštího dne.

Pracovní postup. Test, jímž zjišťujeme pronikání antibiotik dialyzační membránou, provádíme na velkých skleněných mísách 35 × 35 cm s agarovou půdou pro difusní titrace streptomycinu nebo chlortetracyklinu, zaočkovanou testovacím mikroorganismem *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Ševčík 1954, Hess 1955), na niž klademe čtvereček dialyzační membrány 1 × 1 cm (výrobce Kalle u. Co., NDR);

na membránu položíme korkovrtem vyříznutý agarový bloček s vyrostlou aktinomycetou nebo s roztokem antibiotika. Agarové bločky a dialyzační membrány snímáme s plotny v různých časových intervalech (1, 2, 4 a 6 hod.) a plotny inkubujeme v thermostatu 18 hod. při 28 °C. Po inkubaci odčítáme průměry inhibičních zón.

Tab. 3. Velikost inhibičních zón v mm při dialyze antibiotik u aktinomycet na agarových bločcích na půdě S₁

Produkční aktinomyceta	Titrační půda	Doba dialyzy (difuze) v hod.								
		1		2		4		6		K
		A	B	A	B	A	B	A	B	
<i>Streptomyces griseus</i>	STM	21	18,5	22	21	23	21	23	22	23
	CTC	12,5	10,5	15	13	18	16	18	17,5	17,5
<i>Streptomyces 105/5</i>	STM	21,5	0	22	13,5	23	17	23	18,5	24
	CTC	20,5	5	20	10	21	16,5	21	17	21,5
<i>Streptomyces 154</i>	STM	20	0	21	7	21	15,5	21	16	22
	CTC	17,5	0	18,5	10	19,5	15	20	15,5	20
<i>Streptomyces 607</i>	STM	20	0	20,5	6,5	21	15	21,5	15	22
	CTC	17,5	0	18,5	8	20	14	20,5	17	21
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	CTC	20	8	23	15	25	20	26	21	26

A — agarový bloček bez membrány (difuze).

B — agarový bloček s membránou (dialyza).

K — agarový bloček ponechán na agarové plotně do příštího dne.

Titrační půda: STM — pro streptomycin; CTC — pro chlortetracyklin.

Stáří kultur aktinomycet: 23 dny.

Pro kontrolu účinnosti antibiotika v agarových bločcích byly bločky kladeny na agarovou plotnu bez membrány a snímány v týchž intervalech jako u bločků s membránou, případně byly bločky ponechány na agarových plotnách po celou inkubační dobu.

Výsledky a diskuse

Rozdíly mezi velikostmi inhibičních zón u agarových bločků s dialyzační membránou a bez dialyzační membrány jsou uvedeny v tabulce 1 a 2 (antibiotika rozpouštěna v agarových bločcích). Velikost inhibičních zón je většinou přímo závislá na době dialyzy nebo difuze. Inhibiční zony u agarových bločků s membránou jsou poněkud menší než u týchž bločků bez membrány. Podobné výsledky byly získány u agarových bločků s vyrostlými aktinomycetami (tab. 3).

V případě, že u agarových bločků s dialyzační membránou se neobjeví inhibiční zony a u kontrolních bločků bez membrány jsou inhibiční zony poměrně malé, nelze ještě říci, že antibiotikum není schopno pronikat dialyzační membránou. Dialyzační membrána je totiž určitou zábranou při pronikání antibiotik.

Souhrn

Byla vypracována jednoduchá testovací metoda pro stanovení schopnosti pronikat dialyzační membránou u neznámých antibiotik na agarových plotnách.

L i t e r a t u r a

- Hess, J.: *Stanovení účinnosti streptomycinu a dihydrostreptomycinu difusní metodou na kovových plotnách.* Preslia, 27 : 49, 1955.
Ševčík, V.: *Úvod do biochemické analýsy mikroorganismů.* NČSAV, Praha 1954.
Ševčík, V., Podojil, M., Vrtišková, A.: *Použití papírové chromatografie při výzkumu nových antibiotik.* Čs. mikrobiologie 2 : 175, 1957.

Проникновение антибиотиков через диализационную пленку на пластинках агара

В. Шевич и А. Вртишкова

Р е з ю м е

Способность неизвестных антибиотиков проникать через диализационную пленку мы определяем на агаре так, что на пластинку агара, засеянную тест-микробом, кладем квадратик диализационной пленки, на которую кладем блок агара с разросшимися актиномицетами. Для контроля мы кладем блок агара с актиномицетами прямо на засеянную среду, не подкладывая диализационной пленки. Через 6 час. при лабораторной температуре мы снимаем блоки агара и диализационные пленки, и пластинку агара помещаем на 18 час. в термостат при 28 °С. Проникновение антибиотика через диализационную пленку проявляется зоной угнетения на пластинке агара.

The Permeation of Antibiotics through a Membrane for Dialysis on Agar Plates

V. Ševčík and A. Vrtišková

S u m m a r y

The ability of unknown antibiotics to permeate a membrane for dialysis is determined on agar plates by placing a square of membrane on an agar plate inoculated with the test micro-organism and covering it with an agar block with a fully grown culture of the actinomycete. An inoculated agar plate on which an agar block with a mature culture of the actinomycete is placed, without an intervening membrane, serves as the control. After leaving for six hours at laboratory temperature, the agar blocks and ultrafilters are removed and the plates are incubated in a thermostat for 18 hours at 28° C. Permeation of the antibiotic through the membrane is evidenced by an inhibition zone on the agar plate.

Krátká původní sdělení

Sporulace bacilů. V.

Inhibice tvorby spor cystinem u některých zástupců rodu *Bacillus*

VLADIMÍR VINTER

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 22. 2. 1957

Při studiu sporulace mikroorganismu *Bacillus megatherium* jsme zjistili, že přidání cystinu ($1 \cdot 10^{-4}$ M) do kultury před sporulací naruší tvorbu spor a omezí převod vápníku do sporulujících buněk (Vinter 1957). Považovali jsme za nutné si ověřit, zda k tomuto jevu dochází i u jiných bacilů a zda jde tedy o jev obecnější. V této práci popisujeme charakteristiku inhibice tvorby spor cystinem u dalších zástupců rodu *Bacillus*, hlavně skupiny *Bacillus cereus*.

Tab. 1. Inhibice tvorby spor a převodu vápníku do buněk cystinem u různých zástupců rodu *Bacillus*. Obsah vápníku je vyjádřen v mg vápníku na 1 mg celkového dusíku buněk. Údaje v závorkách vyjadřují procento spor v kultuře a jejich charakteristiku. V tabulce jsou pro zjednodušení označeny normální spory zkratkou S, „defektní spory“ DS a praespory P

Mikroorganismus	Obsah vápníku v buňkách					
	Kontroly bez cystinu		Kultury s cystinem Stáří kultury v okamžiku přidání cystinu v hod.			
	Před sporulací	Po sporulací	9	10	11	12
<i>B. cereus</i> X	0,0037 (0)	0,0196 (86,6 % S)	0,0029 (< 5 % P)	0,0030 (< 5 % P)	0,0028 (< 5 % P)	0,0035 (< 5 % P)
<i>B. cereus</i>	0,0053 (0)	0,0337 (87,9 % S)	0,0114 (28,5 % P-DS-S)	0,0078 (20,5 % P-DS)	0,0064 (21,2 % P-DS)	0,0064 (15,2 % P-DS)
<i>B. mycoides</i>	0,0053 (0)	0,0350 (89,7 % S + volné spory)	0,0280 (79,3 % DS-S)	0,0106 (51,5 % P-DS-S)	0,0072 (26,1 % P-DS)	0,0045 (16,8 % P-DS)
<i>B. mesentericus</i>	0,0045 (0)	0,0433 (88,5 % S + volné spory)	0,0076 (< 5 % P-DS)	0,0043 (< 5 % P-DS)	0,0041 (27,8 % P-DS)	0,0042 (21,3 % P-DS)
<i>B. anthracoides</i>	0,0092 (0)	0,0235 (81,3 % S)	0,0218 (61,3 % DS-S)	0,0224 (58,9 % DS-S)	0,0191 (59,8 % DS-S)	0,0117 (38,9 % P-DS-S)

Jako modelů jsme použili dvou kmenů *Bacillus cereus* (kmen označený X byl izolován z půdy), dále *Bacillus mycoides*, *Bacillus mesentericus* a *Bacillus anthracoides*. Způsob kultivace, stanovení procenta spor v kultuře a obsahu vápníku v buňkách jsou popsány v minulé práci (Vinter 1957).

Ve všech pokusech jsme přidávali cystin (konečná koncentrace $1 \cdot 10^{-4}$ M) v hodinových intervalech od ukončení logaritmické fáze (9. hodina kultivace) do 12. hodiny kultivace, tedy do období jedné až dvou hodin před začátkem tvorby spor. Obsah vápníku v buňkách jsme stanovili 12. hodinu kultivace, t. j. před sporulací, a 24. hodinu kultivace, kdy byly kontrolní kultury plně vysporulovány a kdy ještě nedocházelo k masovější autolyse sporangii. *B. anthracoides* sporuloval pomaleji, a proto jsme obsah vápníku v buňkách u vysporulované kultury zjistili až 30. hodinu kultivace.

Výsledky uvedené v tabulce ukazují, že u všech zkoušených bacilů došlo po přidání cystinu do media k inhibici jak tvorby spor, tak převodu vápníku do buněk. U *B. mycoides* a *B. anthracoides* došlo k inhibici různého stupně podle toho, do jak staré kultury byl cystin přidán, tedy k podobnému případu, který jsme již dříve prokázali u *B. megatherium* (Vinter 1957). Tento jev je pravděpodobně způsoben tím, že buňky některých bacilů mají po ukončení vegetativního množení ještě schopnost rychleji rozložit část cystinu, takže během vlastního procesu tvorby spor se již účinek zbytků cystinu nebo jeho rozpadových produktů projevuje mnohem slaběji. U ostatních studovaných bacilů byl proces tvorby spor narušen silně i v kulturách, do kterých byl cystin přidán už po ukončení množení. U *B. cereus* X byla dokonce sporulace prakticky potlačena, protože do 24. hodiny bylo schopno vytvořit praespory pouze necelých 5 % buněk. Praespory i „defektní spory“ všech uvedených bacilů byly svým tvarem i optickými vlastnostmi stejně jako u *B. megatherium*. (Vinter 1957).

Výsledky ukazují, že k inhibici tvorby spor cystinem nedochází pouze u *B. megatherium*, ale i u ostatních zástupců rodu *Bacillus* a že se tedy pravděpodobně jedná o obecnější zákonitost narušení tvorby spor bacilů.

L i t e r a t u r a

Vinter, V.: Sporulace bacilů. IV. Ovlivnění tvorby spor *Bacillus megatherium* cysteinem a cystinem. Čs. mikrobiol. 2 : 80, 1957.

Спорообразование у бацилл. V.

Подавление цистином образования спор у некоторых представителей рода *Bacillus*

V. Винтер

Р е з ю м е

У пяти представителей рода *Bacillus* (2 штамма *Bac. cereus*, *Bac. mycoides*, *B. mesentericus* и *B. anthracoides*) мы проверяли возможность нарушения спорообразования путем прибавления цистина ($1 \cdot 10^{-4}$ M) перед началом этого процесса. Мы установили, что прибавление цистина вызывало морфологические нарушения образования спор, ограничение перехода кальция в спорообразующие клетки и даже утрату клетками способности к спорообразованию.

Sporulation of Bacilli. V.

Inhibition of Spore Formation by Cystine in Some Members of the Genus *Bacillus*

V. Vinter

S u m m a r y

The possibility of inhibiting spore formation by adding cystine ($1 \cdot 10^{-4}$ M) prior to sporulation was investigated in five members of the genus *Bacillus* (two strains of *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. mesentericus* and *B. anthracoides*). It was found that the addition of cystine led to a disturbance in the morphology of sporulation and to a decrease in the transfer of calcium to sporulating cells, and sometimes to loss of ability by the cells to form spores.

Možnost přenosu mikroorganismů metamorfosou pakomára *Chironomus plumosus*

OLEG LYSENKO

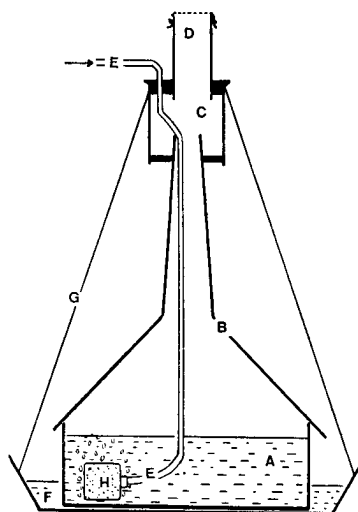
Oddělení patologie hmyzu, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 28. 2. 1957

Otázka přenosu mikroorganismů metamorfosou dvoukřídlého hmyzu, a to hlavně much, byla v minulosti intenzivně studována, avšak nebyla dosud jednoznačně rozřešena. Někteří autoři (Ledingham, cit. Tebbutt 1913, Cao 1906, Graham-Smith 1912a, b, Bacot 1911, 1914, Gosio 1925, Ostrolenk a Welch 1942) takovou možnost potvrzují, jiní (Nichols 1912, Tebbutt 1913 a Wollman 1921) ji popírají.

V poslední době dokazují Brinley a Steinhaus (1942), že se mikroorganismy přenášejí metamorfosou pakomára *Chironomus plumosus*. Larvy pakomára pěstovali v bazénu, který infikovali mikroorganismem *Serratia marcescens* a u vylétujících dospělců tuto bakterii opět prokázali.



Obr. 1. Chovné zařízení pro sledování vlivu metamorfosis larev vodního hmyzu na mikroorganismy. A — chovná nádoba s vodou, B — skleněná nálevka, D — skleněný váleček nahoře uzavřený gázou pro sběr imag, E — provzdušovací zařízení, F — nádoba s desinfekčním roztokem, G — zatemnění, H — porézní vzdušnicí kostka. C — spojovací váleček,

Ze všech uvedených prací jasně nevyplývá, zda šlo skutečně o pravý přenos nebo jen o sekundární kontaminaci již vylíhlých imag. Vzhledem k tomu, že je důležité vědět, zda dospělí komáři jsou schopni letem po okolí roznášet infekční agens z prostředí svého larválního života, jimž jsou většinou nekontrolované odpadové vody, zjišťovali jsme opět, zda dochází u pakomárů k pravému přenosu bakterií jejich metamorfosou. Abychom se vyhnuli nedostatkům, jež se vyskytovaly v předchozích pracích, sestrojili jsme jednoduchý přístroj, který do značné míry vylučuje možnost sekundární kontaminace dospělých pakomárů.

Larvy *Chironomus plumosus* jsme lovíli v eutrofních rybnících v okolí Prahy a ve Vltavě a krmili je autoklávanou suspenzí kvasinek. Jako modelových mikroorganismů jsme použili *Salmonella enteritidis* var. *danizs*, *Streptococcus faecalis* NCTC 6783 a *Escherichia coli*, které jsme dokazovali na Wilson-Blaierově vizmutovém agaru (Sedlák 1955) na mediu s azidem sodným Difco B 442 ztuženým 1,5 % agaru a na Levinově agaru Difco B 5 (Difco Manual 1953). Jako pomnožovacích tekutých medií jsme použili masopeptonového bujonu a živného prostředí Bacto Brillant green bílé 2%.

Chovná aparatura. Přístroj je schematicky znázorněn na obrázku 1. V chovné misce o průměru 150 mm a 75 mm vysoké (A) je infikovaná voda, v které žijí larvy a prodělávají zde svoji metamorfosu. Obsah skleněnou trubici (E) zakončenou porézní kostkou (H). Spodní část chovné aparatury je zatemněna černým papírem (G). Imaga, která vyletují z kukel, jsou váběna světlem, strhávána proudem vzduchu a putují nálevkou (B) vzhůru do skleněného válečku (D), kde se shromažďují. Váleček se shromážděnými imagy jsme každý den vyměňovali a imaga z něj brali na vyšetření. Aparaturu je možno pohodlně sestavit i rozložit a pokus kdykoliv autoklavováním bezpečně zlikvidovat. Probublávání vzduchu mimo obohacování vody kyslíkem způsobuje i slabý přetlak uvnitř tohoto zařízení, čímž snižuje možnost kontaminace z okolí a zároveň proud vzduchu od zdola vzhůru zabraňuje imagům návrat k infikované vodě a tak sekundární kontaminaci.

Vlastní pokusy probíhaly současně ve čtyřech přístrojích. Každá chovná nádoba obsahovala 350 ml vodovodní vody a 50 larev. Do vody v jednotlivých nádobách jsme přidávali suspensi 24 hod. kultury modelových mikroorganismů (*Salmonella enteritidis*, *Streptococcus faecalis* a *Escherichia coli*) v takové koncentraci, aby se počet bakterií pohyboval v rozmezí 10^5 až 10^6 buněk v 1 ml vody. Počet bakterií jsme denně zjišťovali plotnovou metodou na příslušném selektivním mediu a při úbytku jsme přidáváním suspense udržovali množství bakterií na uvedeném počtu. Jedna ze čtyř nádob jako kontrola nebyla infikována. Na plotnách byly odečítány jenom typické kolonie.

Z kukel vyletující imaga byla narkotisována etherem a vyšetřována na přítomnost modelových mikroorganismů v pomnožovacích mediích. U každého imaga jsme vyšetřovali v obou mediích jak jeho povrch, tak i tělní obsah. Nejprve jsme opláchli povrch pakomára přímo ve zkumavce s pomnožovací půdou (napřed v masopeptonovém bujonu a potom v brilant green bile). Potom jsme na sterilním podložním sklíčku imago asepticky lancetou rozdrtili a část tělního obsahu nassáli do skleněné kapiláry. Hrot i s nassátým obsahem jsme ulomili do zkumavky (10 × 100 mm) s 3 ml pomnožovací půdy. Media byla inkubována 2 dny při 37 °C a potom ještě 7 dní při laboratorní teplotě. Obsah zkumavek, v kterých se projevil růst, jsme očkovali na jednotlivé selektivní půdy a masopeptonový agar.

Při dvojitým opakování bylo vyšetřeno 169 imag a z nich jenom u 15, t. j. u 9 % byly prokázány mikroorganismy; ukázalo se, že to byly jen běžné vzdušné saprofytické mikroorganismy (*Sarcina flava*, *S. lutea*, *Bacillus subtilis* a pod.). Šlo zřejmě jen o sekundární kontaminaci při lhnutí imag nebo při manipulaci. Modelové mikroorganismy nebyly nikdy prokázány. V dalších pokusech v totéž uspořádání jsme dospěli bez narkotisace a další manipulace přímo vhodili do pomnožovacích medií. Ani v tomto případě jsme nikdy nezjistili přítomnost modelových mikroorganismů.

Naše výsledky tedy ukazují, že metamorfosou u pakomárů neprochází ani jeden z použitých modelových mikroorganismů (*Salmonella enteritidis*, *Streptococcus faecalis* a *Escherichia coli*). Rovněž Wollman (1921), který pracoval s mouchami, poukazuje na to, že přenos mikrobů metamorfosou není primární, ale že u tohoto hmyzu jde vždy o sekundární kontaminaci až po vylíhnutí. Výsledky Brinleye a Steinhausa (1942), kteří ovšem použili jiné metodiky, ukazují, že přenos je možný. Podle našeho názoru rozdíl mezi našimi a jejich pozorováními je způsoben právě použitou metodikou, neboť oba autoři nevyloučili možnost sekundární kontaminace vylíhlých dospělců.

Z našich výsledků rovněž plyne, že mikroflora střeva larvy pakomára se nepřenáší stadiem kukly do imaga. Ve zdravé larvě jsou bakterie lokalizovány ve střevě, neboť proniknutí mikroflory peritrickou membránou a střevní stěnou do tělní dutiny má za následek smrt hmyzu, což potvrzují i naše dřívější pokusy (Weiser a Lysenko 1956). Při kuklení pak střevní obsah odchází v mekoniu z kukly ven. Rovněž zvýšená fagocytosa ve stadiu kukly spolupůsobí při vnitřní sterilitě dospělce. Metamorfosou mohou tedy projít jen ty bakteriální nálezy, které jsou vázány na tkáň hostitele.

Z mechanismu vylétání imaga z kukly vyplývá, že vylétnuvší imago je i na svém povrchu sterilní. Po roztržení hřbetní pokožky se imago opírá o okraj hrudi kukly a postupně se vysoukává ze zadečku kukly, aniž by se dotklo vody. Jestliže však usedá na okraj nádrže až do zpevnění křídel, dochází k sekundární kontaminaci.

Při mechanickém způsobu přenosu mikroorganismů můžeme pakomáry řadit jen mezi příležitostně synantropní mechanické hmyzí přenašeče.

Děkuji akademiku I. Málkovi, Dr J. Weiserovi a doc. Dr J. Stárkovi za připomínky k této práci.

L i t e r a t u r a

- Bacot, A. W.: *On the persistence of bacilli in the gut of an insect during metamorphosis.* Trans. Roy. Entomol. Soc. London 2 : 497, 1911.
- Bacot, A. W.: *On the survival of bacteria in the alimentary canal of fleas during metamorphosis from larva to adult.* J. Hyg. (plague suppl. 3 : 655, 1914).
- Brinley, F. J., Steinhaus, E. A.: *Some relationships between bacteria and savage-inhibiting insects.* 1942. Cit Steinhaus (1946).
- Cao, G.: *Nuove osservazioni sul passaggio dei microorganismi a traverso l'intestino di alcuni insetti.* Ann. Igiene Sper. 16 : 339, 1906.

- Difco manual*. Difco laboratories. Detroit 1953.
- Gosio, B.: *Über die Verbreitung der Bubonenpesterreger durch Insektenlarven*. Arch. Schiffs. Trop. Hyg., 29 : Beiheft 1; 134, 1925.
- Graham-Smith, G. S.: *An investigation of the incidence of the microorganisms known as non-lactose fermenters in flies in normal surroundings and in surroundings associated with epidemic diarrhoea*. 41st Ann. Rept. Local Govnt. Bd., Supp. Rept. Med. Officer 1911—1912 304, 1912a.
- Graham-Smith, G. S.: *An investigation into the possibility of pathogenic microorganisms taken up by the larva and subsequently distributed by the fly*. 41st Ann. Rept. Local Govnt. Bd. Supp. Rept. Med. Officer 1911—1912 : 330, 1912b.
- Nichols, L.: *The transmission of pathogenic micro-organismus by flies in Sain Lucia*. Bull. Entomol. Res. 3 : 251, 1912.
- Ostrolenk, M., Welch, H.: *The house fly as a vector of food poisoning organisms in food producing establishments*. Am. J. Publ. Health 32 : 487, 1942.
- Sedlák, J.: *Enterobacteriaceae*. St. zdrav. nakl., Praha 1955.
- Steinhaus, E. A.: *Insect microbiology*. Comstock Publ. Co., Ithaca, N. Y. 1946.
- Tebbutt, H.: *On the influence of the metamorphosis of Musca domestica upon bacteria administered in the larval stage*. J. Hyg. 12 : 516, 1913.
- Weiser, J., Lysenko, O.: *Septikemie bource morušového*. Čs. mikrobiol. 1 : 216, 1956.
- Wollman, E.: *Le rôle des mouches dans le transport de germes pathogènes étudié par la technique des élevages aseptiques*. Comt. Rend. Hebdom. Acad. Sci., Paris 72 : 298, 1921.

Возможность переноса микробов через метаморфоз мотыля *Chironomus plumosus*

О. Лысенко

Р е з ю м е

Было установлено, что служившие в качестве модели микробы *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus faecalis* и *Escherichia coli* не способны сопровождать мотыля *Chironomus plumosus* через его метаморфоз. Вылупившиеся взрослые имаго, личинки которых жили в зараженной среде, оказываются совершенно стерильными на поверхности и внутри тела. Эти мотылы способны принимать участие в переносе инфекции только как случайные синантропные механические переносчики.

The Possibility of Bacterial Transfer during the Metamorphosis of the Midge *Chironomus plumosus*

O. Lysenko

S u m m a r y

It was found that the test micro-organisms, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus faecalis* and *Escherichia coli*, did not accompany the midge *Chironomus plumosus* throughout its metamorphosis. The surface and internal parts of the body of the mature imagos which developed from larvae reared in an infected environment, were completely sterile when the imagos emerged from the pupa. Midges can participate only in the mechanical transmission of infection, as chance mechanical synanthropic insect carriers. Explanation to figure: An apparatus for the investigation of transfer of test micro-organisms during metamorphosis of water-inhabiting insects. (A: culture cup for midge larvae, B: glass funnel, D: glass cylinder closed at top by cloth in which imagos are collected, E, H: supply for aeration, F: cup with disinfectant, G: paper cone for maintaining lower part in darkness).

P ř e d b ě ž n á s d ě l e n í

Vztah metabolismu různých uhlohydrátů k produkci chlortetracyklinu
u kmene *Streptomyces aureofaciens*

JOSEF ROKOS a PAVEL PROCHÁZKA

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 7. 4. 1957

Při produkci chlortetracyklinu kmenem *Streptomyces aureofaciens* se všeobecně používá jako zdroje uhlíku sacharosy. Není však známo, zda její jednotlivé složky, glukosa a fruktosa, jsou metabolisovány stejnými nebo odlišnými cestami. Klein a Doudoroff (1950, 1951) se domnívají, že mikroorganismus *Pseudomonas putrefaciens*, běžně kultivovaný na sacharose, metabolisuje její jednotlivé složky různými cestami.

Tab. 1. Produkce chlortetracyklinu kmenem *Streptomyces aureofaciens* při kultivaci na půdách s různými cukry
(Vyjádřeno v μg chlortetracyklinu v 1 ml fermentační tekutiny)

Cukr přidávaný do fermentační půdy	Hodina fermentace				
	24	48	72	96	120
Sacharosa	160	510	890	1210	1260
Fruktosa	180	640	900	1070	1180
Glukosa	100	140	370	520	490

Tab. 2. Průběh pH a množství nevyužitých uhlohydrátů ve fermentační půdě při kultivaci kmene *Streptomyces aureofaciens*
(Vyjádřeno v mg monosacharidů v 1 ml fermentační tekutiny)

Cukr přidávaný do fermentační půdy	Hodina fermentace					
	0	24	48	72	96	120
pH						
Sacharosa	6,90	6,62	6,41	6,28	6,25	6,70
Fruktosa	6,90	6,73	6,68	6,53	6,62	6,91
Glukosa	6,90	6,19	6,23	6,14	6,50	7,45
Množství nevyužitých uhlohydrátů						
Fruktosa	30,3	29,1	23,3	17,8	13,0	8,0
Glukosa	30,3	23,5	12,0	6,0	0,9	0,7

Zajímalo nás, zda k podobnému jevu dochází i při kultivaci aktinomycety *Streptomyces aureofaciens*, zejména s ohledem na vliv jednotlivých metabolických cest na produkci antibiotika. Nahradili jsme proto ve fermentační půdě (Bělík a sp. 1956) sacharosu stejným váhovým množstvím fruktosy nebo glukosy. Monosacharidy, které jsme v koncentrovaném roztoku sterilisovali filtrační skleněným fil-

trem S 5, jsme asepticky přidávali do baněk tak, aby byla zachována stejná konečná koncentrace živin a objem fermentační tekutiny jako v kontrolní půdě se sacharosou. V průběhu kultivace na reciprokém třepacím stroji jsme v jednotlivých časových intervalech stanovovali produkci chlortetracyklinu, úbytek monosacharidů a pH. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tab. 1 a 2.

Zjistili jsme, že produkce chlortetracyklinu v médiu s fruktosou dosahuje přibližně stejných hodnot jako v médiu se sacharosou, v některých případech hodnot dokonce daleko vyšších. V prostředí s glukosou dochází ke zcela opačnému jevu. Produkce je zde daleko nižší než při fermentaci se sacharosou či fruktosou, při čemž čísla uvedená v tab. 1 jsou maximální hodnoty zjištěné v řadě pokusů. Růst organismu je však přibližně stejný, at použijeme kteréhokoli z uvedených cukrů. Rozdílnost fermentací na glukose a fruktose potvrzuje rovněž průběh pH a rychlost spotřeby cukrů (tab. 2). Dalším charakteristickým rozdílem při kultivaci s různými substráty je pigmentace mikroorganismu.

Tyto výsledky naznačují možnost, že jednotlivé složky sacharosy jsou odlišně metabolisovány, při čemž produkce chlortetracyklinu je ovlivněna typem uhlohydrátu ve fermentačním prostředí.

Z literatury je známo, že produkce chlortetracyklinu je spjata s oxydativním štěpením cukrů, kdežto s glykolysou podstatně méně (Di Marco a sp. 1956, Boretti a sp. 1956). Byla-li oxydativní cesta potlačena enzymatickým jedem (arsenitan) a vyvolána glykolysa, byla podstatně snížena produkce antibiotika, aniž došlo k ovlivnění růstu organismu. Títož autoři dokázali, že produkční mycel kultury *Streptomyces aureofaciens* je vybaven enzymy dvou metabolických cest, a to glykolytické a oxydativní, a domnívájí se, že pro biosyntesu chlortetracyklinu je vhodná optimální rovnováha těchto dvou cest. Z našich výsledků bylo možno předpokládat, že volbou uhlohydrátové složky lze měnit poměr oxydativního a glykolytického štěpení cukrů. Domníváme se, že fruktosa je metabolisována více oxydativní cestou než glukosa. Této možnosti nasvědčuje i další pokus, ve kterém jsme použili k potlačení glykolysy kyseliny monojodoctové, kterou jsme přidávali ve 12. hod. fermentace (konečná koncentrace $2 \cdot 10^{-4}$ M). Přídavkem kyseliny monojodoctové jsme skutečně dosáhli zvýšení produkce chlortetracyklinu v půdě s glukosou na 700 $\mu\text{g/ml}$ proti 100 $\mu\text{g/ml}$ v půdě bez kyseliny monojodoctové. Podobné výsledky jsme získali s fluoridem sodným. Po přidání fluoridu sodného (10^{-2} M) ve 12. hod. fermentace do půdy se sacharosou se zvýšila rovněž produkce chlortetracyklinu. Přidávané inhibitory měly na produkci chlortetracyklinu daleko větší vliv v počáteční době fermentace (od 8. do 20. hod.) než v pozdějších hodinách.

Uvedené výsledky se shodují s prací Matelové a sp. (1955), kteří zjistili značný vliv změn příkonu kyslíku do fermentační půdy na produkci chlortetracyklinu v raných hodinách kultivace. Je otázkou, zda kultura *Streptomyces aureofaciens* nereaguje na vnější zásah citlivěji v raných hodinách kultivace než pozdějších v souvislosti s možnými změnami v intenzitě aerobní a glykolytické cesty metabolismu cukrů.

L i t e r a t u r a

- Bělík, E., Herold, M., Doskočil, J., Mrva, J.: Výzkumná závěrečná zpráva. 1956.
 Boretti, G., Di Marco, A., Julita, P., Raggi, F., Bardi, U.: *Presenza degli enzimi della via esosomono-fosfato ossidativa nello Streptomyces aureofaciens*. Giornale di microbiologia 1 : 406, 1956.
 Klein, H. P., Doudoroff, M.: *The mutation of Pseudomonas putrefaciens to glucose utilisation and its enzymatic basis*. J. Bact. 59 : 739, 1950.
 Klein, H. P.: *Fructose utilisation by Pseudomonas putrefaciens*. J. Bact. 61 : 524, 1951.
 Di Marco, A., Boretti, G., Julita, P., Pennella, P.: *Researches on carbohydrate metabolism in Streptomyces aureofaciens in connection with chlortetracycline production*. Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires 11 : 140, 1956.
 Matelová, V., Musílková, M., Nečásek, J., Šmejkal, F.: *Vliv přerušovaného vzdušnění na produkci chlortetracyklinu*. Preslia 27 : 27, 1955.

Отношение метаболизма различных углеводов к продукции хлортетрациклина у штамма *Streptomyces aureofaciens*

И. Рокос и П. Прохазка

Резюме

Мы установили, что присутствие в среде сахарозы, фруктозы и глюкозы сильно влияет на продукцию хлортетрациклина штаммом *Streptomyces aureofaciens*. В среде с фруктозой продукция хлортетрациклина достигает почти таких же размеров, как в среде с сахарозой, а в некоторых случаях — даже более значительных. В среде с глюкозой его продукция бывает гораздо ниже, чем при ферментации с сахарозой или фруктозой. — Исследовалось также влияние некоторых энзиматических ядов. Моноiodуксусная кислота повышала продукцию хлортетрациклина в среде с глюкозой, тогда как фтористый натрий — в среде с сахарозой.

The Relationship of the Metabolism of Different Carbohydrates in the Production of Chlortetracycline by *Streptomyces aureofaciens*

J. Rokos and P. Procházka

S u m m a r y

The production of chlortetracycline by *Streptomyces aureofaciens* was found to be markedly affected by the presence of saccharose, fructose and glucose in the medium. The production of chlortetracycline in a medium containing fructose attained approximately the same values as those obtained in a medium containing saccharose, and in some cases even higher values. In a medium containing glucose, production was far lower than on fermentation with saccharose or fructose. The effect of some enzymatic poisons was also tested. Monoiodoacetic acid increased the production of chlortetracycline in media containing glucose, while sodium fluoride increased production in media containing saccharose.

Z p r á v y

Zpráva o celostátní poradě o ochraně průmyslových výrobků proti biologickému znehodnocování

Ve dnech 7. a 8. května 1957 se konala v Liblicích pracovní porada svolaná Biologickým ústavem ČSAV a sekretariátem státního plánu výzkumu při ČSAV o problému ochrany průmyslových výrobků proti biologickému znehodnocování, t. j. proti poškozování bakteriemi, plísněmi, dřevokaznými houbami a pod.

Porada byla svolána proto, aby byl získán přehled o současném stavu výzkumu a praxe, aby byl zhodnocen národohospodářský dosah biologické korose a aby na základě těchto poznatků mohl být co nejučinněji a nejučelněji koordinován další základní i aplikovaný výzkum. Zúčastnili se jí pracovníci výzkumných ústavů i zástupci průmyslu.

V zahajovacím referátě poukázal akademik Málek na dřívější nedoceňování biologického faktoru při znehodnocování různých materiálů a zdůraznil dosavadní živelnost při řešení otázek biologické korose a nutnost koordinace.

V hlavních přednáškách objasnil Ing. Roubal (Výzkumný ústav ochrany materiálu) některé základní pojmy a vymezil čtyři základní cesty ochrany proti korosi (výběr materiálu, konstrukční úpravy, úprava vnějšího prostředí a povrchové úpravy) a V. Zánová (Biologický ústav ČSAV) se dotkla správné volby zkušebních mikroorganismů a jejich dalšího udržování, zdůraznila důležitost volby materiálu a nutnost jednotných metodik pro výběr materiálu.

Odborné referáty zahájil Ing. Payer a V. Payerová (Plynárenský ústav) sdělením o mikrobiální odolnosti izolací potrubí v zemi. Plynárenský ústav vypracoval novou antikorošni bandáž pro izolace potrubí a opravy izolací elektrických kabelů, která je odolná vůči působení plísní a půdních bakterií a odstraňuje obtížnou a těžkopádnou práci s horkým asfaltem v terénu. Problém byl řešen s hlediska fyzikálně chemického i biologického současně a byla vyzdvížena účelnost spolupráce korosních odborníků a biologů.

V dalším referátě upozornil Ing. Barta (Výzkumný ústav kvasného průmyslu) na velké korose, které vznikají vlivem sírných bakterií na vodních dílech a na potrubí, zejména v půdách bohatých na sirany. Výzkum v tomto oboru je velmi nutný a nalezení prostředků proti účinku sírných bakterií by přineslo velké úspory.

Ing. Doležel (Výzkumný ústav ochrany materiálu) podal přehled současného stavu ochrany plastických hmot proti plísním, uvedl způsoby ochrany a požadavky, které jsou kladeny na fungicidní látky pro plastické hmoty a vyjmenoval řadu sloučenin, které se osvědčily jako ochrana určitých plastických hmot. V závěru svého referátu zdůraznil nutnost vyřešení ochrany termosetických materiálů a pryží, vypracování zdravotních předpisů pro práci s fungicidními látkami, řešení problému adaptace na fungicidy a nutnost hledání nových látek s vystupňovanými fungicidními a baktericidními vlastnostmi a se sníženou toxicitou. Plastických hmot se týkalo také další sdělení Ing. Bomara (Výzkumný ústav obalový), který hovořil o odolnosti polyvinylchloridu, polyamidu a polyethylenu proti mikroorganismům za obtížných skladovacích podmínek.

Další dva referáty se zabývaly ochranou dřeva a dřevěných výrobků. Pracovníci Výzkumného ústavu technologie dřevoprůmyslu Ing. Ledvina a Ing. Čermák ve svém referátu hovořili zejména o impregnaci dřeva jako způsobu, jímž lze prodloužit životnost dřeva a snížit těžbu. Ing. Koukal seznámil účastníky konference s prací Výzkumného ústavu dřevařského v Bratislavě, kde sledují jednak napadání a rozklad dřeva houbami, jednak řeší problém ochrany dřevní suroviny, materiálu a tropikalizaci dřeva, to znamená ochranu proti tropickému klimatu. Oba dřevařské ústavy chtějí zavést chov termitů a testovací metodiky na odolnost materiálů proti těmto škůdcům.

Ing. Malivánková (Výzkumný ústav průmyslu papírenského) zdůraznila nutnost řešení otázky ochrany papírových obalů a speciálních papírů určených pro tropy a otázky konservace surovin a pololátek zpracovaných v papírenském průmyslu (dřevo, dřevovina, buničina, atd.).

O problémech koželužských, které zasluhují řešení, referoval promováný biolog P. Šafařík. Jde především o zlepšení conservačních metod a suroviny a odstranění ztrát způsobených rozkladem tríslovin.

O organizaci a současném stavu výzkumu v elektrotechnické tropické stanici v ČLR podal zprávu Dr. Blahník, který také seznámil účastníky konference s výsledky laboratorních zkoušek elektrických izolantů provedených ve Výzkumném ústavu silnoproudé elektrotechniky, a zmínil se též o požadavcích na základní mikrobiologický výzkum.

Další referát Ing. Zajíčka z Výzkumného ústavu antibiotik se týkal problému, jak zabránit toxickému působení železa při biosyntese chlortetracyklinu a oxytetracyklinu. Osvědčila se vrstva ce-

ment—vodní sklo, která snese sterilisaci, brání styku železa s živnou půdou a současně brání korozi železa a zvyšuje životnost fermentačních tanků. Vyřešením tohoto problému bude možno zavést výrobu chlortetracyklinu v n. p. Penicilin o tři roky dříve.

Druhý den porady zahájili svými referáty pracovníci Výzkumného ústavu agrochemické technologie (Dr. Bečka, Dr. Toman, Ing. Štota, PhMr. Škrobal); jejich zprávy se týkaly jednak některých fungicidních látek, jednak výběrových a srovnávacích zkoušek pro fungicidy. Šlo především o organické sloučeniny rtuti typu $RHgX$, kde R je alkyl, aryl nebo heterocyklický radikál a X je anion, nejčastěji jednoduchý anorganický nebo octanový iont. Další referát se týkal jednojaderných a vícejaderných fenolů a některých příbuzných látek.

Poslední referát V. Zánové se týkal zkušebních metodik na odolnost materiálu proti plísním. Biologický ústav vypracoval metodiky, které zahrnují tři způsoby zkoušek: zkoušku materiálů samotných, zkoušku materiálů chráněných fungicidní látkou a zkoušku trvanlivosti fungicidní látky aplikované v materiálu. Tyto metodiky mají nahradit staré a nevyhovující mezinárodní normy pro testování materiálů.

Ze všech přednesených referátů a písemně podaných materiálů vyplynulo, že mikrobiální korose způsobuje každoročně našemu národnímu hospodářství stamilionové ztráty. Ve výzkumu se již dosáhlo některých úspěchů, jako na příklad ve vypracování testovacích metodik, ve vyřešení ochranných izolací pro potrubí, v aplikaci fungicid v plastických hmotách a ve výrobě nových fungicid. Realizace ve výrobě je však dosud nedostatečná.

Referující i ostatní účastníci konference velmi kladně hodnotili přínos a metodickou pomoc Biologického ústavu ČSAV.

Na závěr porady přijali účastníci resoluci, která doporučuje:

1. Koordinovat v oboru biologické korose základní výzkum v Biologickém ústavu ČSAV a aplikovaný výzkum ve Výzkumném ústavu ochrany materiálu G. V. Akimova.
2. Zaměřit výzkumnou činnost zejména na studium ochrany vodních staveb, zařízení v zemi a hlavních exportních výrobků.
3. Pokračovat a rozvíjet dosavadní výzkum a rozšířit jej na kovy a anorganické materiály.
4. Rozvíjet výzkum ochranných látek i s hlediska zdravotní nezávadnosti.

Konference navrhla zařadit problém „Korose v přirozených podmínkách“, jehož součástí je i biologická korose, do jednotného státního plánu.

Ema Vintrová

Druhá všesvazová konference o antibiotikách konaná v Moskvě ve dnech 31. května — 9. června 1957

Ve dnech 31. května až 9. června 1957 probíhala v Moskevské státní universitě v Moskvě II. Všesvazová konference o antibiotikách. Konferenci pořádalo ministerstvo zdravotnictví SSSR. Zúčastnilo se jí téměř 2000 delegátů, pracujících ve výzkumu antibiotik, v technologii výroby antibiotik a na použití antibiotik v klinické i mimoklinické praxi. Na rozdíl od první konference, která se zabývala především koordinací výzkumných plánů pracovišť SSSR, probíhala druhá konference za účasti delegátů lidového demokratických států. Tím byla i tato konference ve skutečnosti druhou konferencí antibiotik socialistického tábora a navazovala tak na první konferenci pořádanou před dvěma lety ve Varšavě.

Ze zahraničních delegací byla nejpočetnější delegace z ČSR (7 pracovníků). Konference se dále zúčastnily delegace z Čínské lidové republiky, Polské lidové republiky, Maďarské lidové republiky, Bulharské lidové republiky, Rumunské lidové republiky, Německé demokratické republiky, Federativní lidové republiky Jugoslavie a Mongolské lidové republiky. Z USA se zúčastnil konference S. A. Waksman, který byl v té době na návštěvě v SSSR. Vzácným hostem na konferenci byl i významný zdravotnický pracovník S. S. Sokhey z Indie, laureát Stalinovy ceny míru, který již delší dobu aktivně sleduje práci na antibiotikách v zemích socialismu a proto se velmi aktivně zúčastnil zvláště závěrečných jednání, při nichž propagoval jednak rychlé převádění výsledků do praxe a jednak urychlené poskytnutí pomoci zvláště těm zemím, které potřebují zavést výrobu antibiotik.

Části konference se zúčastnila ministryně zdravotnictví SSSR M. D. Kovrigina. Prvé čtyři dny byly přednášeny všechny referáty v plenárním zasedání. V dalších dnech byly referáty rozděleny do tří sekcí: 1. sekce biologie producentů, chemie a technologie antibiotik; 2. sekce experimentálně klinického výzkumu antibiotik; 3. sekce získávání a výzkumu nových antibiotik. Konference měla v první řadě ukázat v celé šíři problematiku výzkumu a vývoje antibiotik v SSSR a lidově demokratických státech, naznačit další směry výzkumu, ukázat a doporučit nejvhodnější metody a vytvořit podmínky pro sjednocení výzkumu antibiotik v SSSR a lidově demokratických státech.

Československá delegace přednesla celkem 8 referátů, které představovaly nejdůležitější výsledky na všech úsecích výzkumu antibiotik. Jednotlivé přednášky i soubor referátů jako celek vzbudily mimořádnou pozornost (jak bylo zdůrazněno i v závěru konference) především i tím, že ve většině případů ukazovaly i nové cesty a přístupy, které na konferenci buď nebyly zastoupeny nebo byly zastoupeny neúplně. Proto i část referentů byla pozvána do předsednictva plenárních zasedání. Práci vykonanou v Biologickém ústavu ČSAV při hledání nových antibiotik i při rozpracování vhodných metodik přednesl ve svém referátě I. Málek; práce vzbudila pozornost jak originálním přístupem spočívajícím daleko více než na pracovištích sovětských v biochemické analýze producentů, tak i některými výsledky o roli polyenových antibiotik (Ševčík a spol.). Zeela mimořádný zájem vzbudil referát P. Málka o lymfotrofních antibiotikách; bylo konstatováno, že práce zahajuje nový směr ve výzkumu i použití antibiotik v klinické praxi. Po předneseném referátu byl P. Málek jako čtvrtý člen čs. delegace vzat do prezidia konference. Referát M. Herolda, doplněný referátem V. Školy o výrobě technických preparátů chlortetracyklinu pro krmení účely i o výsledcích, kterých bylo při jeho použití dosaženo, odkryl na konferenci jinak nezastoupenou část výzkumu použití antibiotik, která je právě dnes pro Sovětský svaz při jeho velkých úkolech v živočišné výrobě mimořádně důležitá. Na plenárním zasedání byl přenesen i referát O. Mikeše a F. Šorma o chemickém složení sovětského antibiotika albomycinu, který ukázal jako nesporně tvrzení amerických badatelů, že albomycin je totožný se známým již antibiotikem griseinem. O ostatních našich referátech a jejich ohlasu se zmiňujeme u jednotlivých sekcí. Referát S. A. Waksmana se zabýval celkem známými zkušenostmi o sociálním významu antibiotik.

Z prací týkajících se biologie producentů antibiotik přednesených na plenárním zasedání nebo v sekcích měl v první řadě větší význam referát N. A. Krasilnikova, v němž autor ukázal základní problematiku morfologie a fyziologie aktinomycet jako producentů antibiotik. Větší pozornost vzbudily též referáty S. I. Alichanjana a jeho spolupracovníků týkající se selekce producentů antibiotik. Praktické výsledky byly získány při použití metody hybridisace, UV-záření, X-paprsků, ethyleniminu a aktinofága jako mutagenního faktoru. Zajímavé výsledky s hlediska fyziologie producenta penicilinu přednesl N. D. Ijersalimskij ve svém referátu o vývojových stádiích na plísní *Penicillium chrysogenum* při hloubkové kultivaci. Z referátů zabývajících se biosyntesou antibiotik zasluhovaly větší pozornost referáty M. M. Levitova o účasti některých aminokyselin v biosyntese penicilinu, N. S. Jegorova o vlivu inositu a látek s guanidinovou skupinou na biosyntesu streptomycinu, dále o vlivu p-dimethylaminobenzaldehydu na tvorbu chlortetracyklinu a referát M. A. Gubernijeva o metabolismu nukleových látek a fosforu u *Act. aureofaciens*. Velmi zajímavý byl referát čínského delegáta Shen-San-Chinn o průběhu biosyntesy chlortetracyklinu, který do značné míry objasňoval cestu vzniku jednotlivých meziproduktů. Pro nás byl tento referát velmi důležitý, neboť také u nás se pracuje na těchto otázkách, kde jsme zjistili, že vlivem organických rhodanidů (benzylrhodanid) je možno podstatně ovlivnit děje při biosyntese aureomycinu (přerušování vzdušnění, nepříznivý vliv vyšší hladiny anorganických fosfátů, atd.). Vliv fosfátů na průběh biosyntesy chlortetracyklinu, vliv železa a odstraňování tohoto vlivu přidáním komplexonů, byly předmětem několika dalších zajímavých sovětských, čínských i našich referátů.

Biologii producentů antibiotik se dále zabývala řada referátů: N. A. Krasilnikov a L. V. Kalakuckij — o antagonistech mezi t. zv. anaerobními aktinomycetami, R. A. Maximova — o výskytu kmenů produkujících fumagilin v přírodě, N. O. Blinov — o studiu producentů protihoubových antibiotik typu kandidicidinu, A. G. Kučajeva — o aktinomycetách skupiny *Act. lavandulae*, A. I. Korenjako — o producentech streptomycinu, E. S. Kudrina — o producentu albomycinu. Velkou pozornost vzbudil referát o vynuceném antagonismu Mečnikovova žáka Šillera, který na této otázce teoreticky jistě pro antibiosu velmi důležité pracuje téměř půl století.

Další skupina referátů, z nichž uvádíme jen některé zajímavější, se týkala chemických a technologických otázek při izolaci antibiotik. V této skupině byly předneseny převážně referáty z výzkumných ústavů a daleko méně referáty z úseku technologie a zkušenosti ze závodů. Byla to skupina referátů týkajících se izolace penicilinu V, chemických vlastností penicilinu V, rychlosti jeho rozkladu (G. I. Kleiner, A. S. Chochlov, B. P. Bruns se sp. atd.). Jeden ze zajímavých referátů se týkal syntesy asi čtyřiceti aminů potřebných pro přípravu soli penicilinu depotního charakteru (Z. V. Puškarjeva). Další referáty jednaly o izolaci antibiotik pomocí měničů iontů. Několik referátů se týkalo izolace a čištění streptomycinu na měničích typu divinylbenzenmetakrylová kyselina. Z těchto referátů vyplynulo, že bylo připraveno několik měničů iontů, z nichž poslední označení KFUCH považují autoři za optimální pro izolaci a čištění streptomycinu. Zajímavé bylo také, že se podařilo vypracovat metodu a připravit měniče iontů vhodné pro izolaci oxytetracyklinu a do jisté míry i chlortetracyklinu (měnič SBS 3) a albomycinu (měnič iontů CDV-3, G. V. Samsonov, Leningrad). Z těchto referátů vyplývá, že jak skupina pracovníků leningradských, tak moskevských přednesla velmi konkrétní a důležité poznatky z tohoto úseku. Další referáty z této skupiny se týkaly přípravy dihydrostreptomycinu (S. M. Maniofe) a získání krystalického erythromycinu (D. M. Trachtenberg). Jeden referát pojednával o zajímavé otázce použití methylsiloxanu jako odpěňovačů (P. S. Zasypkina). Ze závažnosti obsahu většiny referátů i z jejich počtu vyplynul značný pokrok, kterého bylo v SSSR v posledních letech dosaženo ve výzkumu a technologii antibiotik.

V této sekci byly předneseny také referáty členů naší delegace E. Bělíka, „Vliv benzylrhodanidu na produkci chlortetracyklinu“, a V. Ševčíka, který se týkal otázky enzymů při biosyntese aktinomycinů. Referát Bělíkův byl velmi zajímavý a důležitý, protože tato látka podstatně zvyšuje výtěžky chlortetracyklinu i u kmenů s vysokou produkcí. Na konferenci se ukázal i jeho význam teoretický, neboť dává nové možnosti pro ovlivnění biosyntesy chlortetracyklinu. Přednesení zkušeností o fermentační výrobě chlortetracyklinu si přímo vyžádala sovětská strana. Referát V. Ševčíka byl velmi zajímavý zvláště s hlediska teoretického, protože ukazuje nové cesty ke studiu biosyntesy a fermentaci neznámých antibiotik.

Referáty zabývající se popisem nových antibiotik byly předneseny pracovníky z Ústavu pro získávání nových antibiotik v Moskvě (protibakterijní antibiotika krystalomycin a aktinoidin, protivirová antibiotika heliomycin a cerulomycin), dále pracovníky z Vsesvazového výzkumného ústavu antibiotik v Moskvě (protivirové antibiotikum aktinoxanthin), z Gamalejova Ústavu epidemiologie a mikrobiologie v Moskvě (sekazin), z Mikrobiologického ústavu AV SSSR (nová protivirová antibiotika z aktinomyceet) a jiné. Větší počet referátů se zabýval metodikami pro získávání antibiotik s protitumorovým a protivirovým účinkem. U prvních byla propracována vedle pokusů na zvířatech (myších), zvláště japonská metoda využívající vlivu antibiotika na oxydoredukční schopnost suspendovaných buněk ascitického Ehrlichova tumoru. U jiných dále běžných metod používali pokusů na zvířatech nebo na tkáňových kulturách s virem chřipky, a tu zaslouží pozornost skutečnost, že účinek některých antibiotik na polyvalentní aktinofágy jde souběžně s účinkem na některé viry.

Experimentálně klinická sekce výzkumu antibiotik se sešla šestkrát v půldenních zasedáních za předsednictví předních pracovníků v oboru teorie a praxe antibiotik (Z. V. Jermoljeva, P. N. Kaškin, Ch. Ch. Planjeles, V. Ja. Šlapoberskij, G. P. Rudnjev, P. Málek, atd.). Bylo předneseno 93 referátů vedle četných koreferátů a diskusních příspěvků. Byly probírány všechny otázky antibiotik, na které hledá odpověď klinika ve své denní praxi, jako je otázka citlivosti mikroorganismů na antibiotika, farmakodynamika jednotlivých antibiotických preparátů, otázka vedlejších příznaků a nových syndromů vznikajících po podání antibiotik a pod. V otázkách vzniku resistance mikrobů byla věnována pozornost všem hlavním mikroorganismům (stafylokoky, salmonelly, *E. coli* atd.). Je zajímavé, že poměrně málo referátů bylo věnováno epidemiologickým otázkám ve vzniku resistantních stafylokoků v prostředí nemocnic, a to pravděpodobně proto, že následkem racionálního používání antibiotik komplikace vyvolané resistantním stafylokokem nejsou ještě v Sovětském svazu tak hrozivé jako ve státech, kde je antibiotik používáno často nekriticky. Pokládali jsme za svoji povinnost zvláště na tuto otázku v diskusi upozornit (P. Málek). V otázkách komplikací po podávání antibiotik bylo zvláště mnoho referátů věnováno problému kandidomykos, který byl sledován na modelových infekcích i na nemocných na klinice.

Velkou pozornost je nutno věnovat referátům ze školy Z. V. Jermoljevové, která velmi správně zdůrazňuje nejen nutnost hledání nových antibiotik, ale i možnost vypracovávání nových preparátů již známých antibiotik nebo jejich vzájemných kombinací. Známé jsou již její preparáty penicilinu s ekmolinem. Na konferenci uvedla se svými spolupracovníky další preparáty s ekmolinem, jako ekmolin s tetracykliny (ekmobiomycin). Je zajímavé, že tato antibiotika s ekmolinem účinkují i na kmeny resistantní, na samotný penicilin nebo biomycin, a vytvářejí ve tkáních organismu podstatně vyšší

koncentrace. Následkem toho jsou tyto kombinované preparáty penicilinu a tetracyklinu účinnější než samotný penicilin nebo chlortetracyklin, jak bylo dokázáno v experimentu na příklad u pneumokokových sepsi nebo u dysenterie. Pozornosti zasluží též preparát tetracyklinu s dibenzylethylendiaminem (DBED), tedy obdoba superdepotních preparátů penicilinu. Mimo tyto kombinace nebo nové sole antibiotik bylo upozorněno na možnost praktického použití některých nových antibiotik jako kolimycinu a mycerinu patřících do skupiny neomycininových preparátů. Dále je to neocid, preparát zhotovený V. S. Derkačem a účinný proti nádorům.

Prakticky cenné a důležité jsou též práce ze školy Ch. Ch. Planjelese, který již mnoho let zdůrazňuje, že na účinné koncentrace v místě infekce nelze soudit jen podle hladin v krvi, ale že je nutno důsledně sledovat rozprostření jednotlivých antibiotik v organismu a jejich průnik do různých tkání. Referáty přednesené z tohoto oddělení na konferenci rozvíjejí dále tuto otázku. Byly sledovány na příklad otázky koloběhu tetracyklinových antibiotik v organismu, vazba těchto antibiotik na bílkoviny sera i tkání a podobně. Vedle těchto skupin prací, na které bylo stručně upozorněno, byly předneseny další desítky referátů ze všech oborů medicíny, z kterých bylo lze usuzovat na rozvíjení otázek antibiotik u infekčních chorob, v chirurgii, u tuberkulózy, oftalmologii atd. Ze všech referátů vyplynulo, že antibiotika se v Sovětském svazu stala léky, jejichž používání proniklo do nejširšího terénu a že těsný svazek mezi terénem a výzkumnými středisky je zárukou dalšího úspěšného rozvíjení otázek používání antibiotik v klinice. V této sekci se také velmi dobře uplatnila práce přednesená čs. delegací z Biologického ústavu ČSAV (J. Rokos, M. Burger, P. Procházka), která odkryla jako zdroj vedlejších nepřímých účinků při aplikaci chlortetracyklinu jeho účinek na pankreatické enzymy i cestu jak tento účinek odstranit.

Po skončení konference, jejíž zasedání trvala každodenně od 9 hodin ráno do pozdních hodin večerních s krátkou polední přestávkou, jsme se snažili v několika málo zbývajících dnech seznámit se co nejvíce s prací jednotlivých moskevských pracovišť, která řeší otázku antibiotik. V Sovětském svazu se pracuje na výzkumu antibiotik ve třech rovinách: na pracovištích Akademie věd SSSR se řeší obecně teoretické otázky jako systematika a ekologie producentů (N. A. Krasilnikov, A. J. Korenjako, G. K. Skrjabin); v nově budovaném Ústavu biologické fyziky bude zřízena pod vedením S. I. Alichanjana laboratoř, která bude řešit teoretické otázky selekce producentů pomocí prudce účinkujících činitelů. V Akademii lékařských věd SSSR pracuje na otázkách hledání nových antibiotik nově vybudovaný Ústav pro hledání nových antibiotik (S. D. Judincev, G. F. Gauze, M. G. Bražnikova, V. A. Šorin) a Planjelesova laboratoř v Gamalejově Ústavu epidemiologie a mikrobiologie. Ministerstvo zdravotnictví SSSR má pro otázky antibiotik Všesvazový výzkumný ústav antibiotik v Moskvě (ředitel M. A. Guberninjev), který v posledních letech prudce vzrostl (má dnes téměř 500 pracovníků) a zabývá se hlavně rozpracováváním antibiotik pro výrobní i klinickou praxi. Byl nově zřízen Výzkumný ústav antibiotik v Leningradě (ředitel P. N. Kaškin), který se podle přednesených referátů zaměřuje hlavně směrem klinické aplikace, a ústav ve Sverdlovsku. Vedle toho se však pracuje na problematice antibiotik i na vysokých školách (Biologická fakulta Moskevské university a jiné) a v Ukrajinské akademii věd.

Podáváme stručný přehled o práci na moskevských pracovištích.

Mikrobiologický ústav AV SSSR v Moskvě

Výzkumu antibiotik se věnuje velká pozornost ve třech odděleních ústavu. 1. V oddělení proměnlivosti a dědičnosti mikroorganismů, vedeném ředitelem ústavu A. A. Imšeneckim, se řeší obecné principy selekce antibiotických mikroorganismů. 2. V oddělení vzájemných vztahů mikroorganismů, vedeném N. A. Krasilnikovem, je práce zaměřena především na studium antagonismu jako obecného jevu. Část prací je věnována významu antagonismu pro systematiku aktinomycet. Na tuto práci navazuje studium ekologie antagonistů a dále použití antagonistů a antibiotik proti chorobám rostlin. Větší pozornost se věnuje protivirotickým antibiotikům. 3. V oddělení technické mikrobiologie, které vede V. N. Šapošnikov, pracuje N. D. Jerusalimskij, zástupce ředitele ústavu, který se zabývá především fyziologickými stadii producentů antibiotik. V oddělení se řeší řada problémů, zabývajících se studiem biosyntesy antibiotik.

Po skončení konference přednášel V. Ševčík v Mikrobiologickém ústavu AV SSSR na žádost vedoucích pracovníků tohoto ústavu o mikrometodách používaných při výzkumu nových antibiotik, které byly vypracovány v Biologickém ústavu ČSAV. Přednášky I. Málka a V. Ševčíka se staly podkladem pro širší diskusi v Mikrobiologickém ústavu AV SSSR o společném výzkumném plánu v oboru antibiotik. Na závěr diskuse byl vyhotoven koncept společného výzkumného plánu v oboru antibiotik pro Mikrobiologický ústav AV SSSR a Biologický ústav ČSAV, který bude předložen oběma akademiím ke schválení. Práce na společném plánu bude zahájena již v II. pololetí 1957.

Katedra mikrobiologie na biologické fakultě Státní Lomonosovovy university v Moskvě (vedoucí V. N. Šapošnikov).

Fyziologie mikrobtů vzhledem k produkci antibiotik je řešena pod vedením V. N. Šapošnikova a N. D. Jerusalimského. Pod vedením N. A. Krasilnikova je zde řešen problém toxikosity půdy. Zajímavé výsledky byly získány při sledování toxicity půd z různých oblastí SSSR. Toxicita půd může být způsobována jednak anorganickými látkami a jednak produkty látkové výměny mikroorganismů (antibiotiky). Pozoruhodné výsledky zde byly získány též u akumulace radioaktivních látek bakteriemi.

Ústav pro hledání nových antibiotik Akademie lékařských věd (ředitel S. D. Judincev) v Moskvě.

Poměrně rozsáhlý ústav (téměř 200 pracovníků) vznikl z Laboratoře pro hledání nových antibiotik

Akademie lékařských věd, jejíž základ byl vytvořen v roce 1948. Základní problematikou ústavu je získávání nových antibiotik s protibakterijním, protivirovým a protitumorovým účinkem. Ústav má oddělení biologie producentů (G. F. Gauze), oddělení izolace a čištění antibiotik (M. G. Bražnikova), oddělení farmakologie a experimentální terapie (V. A. Šorin) a pomocnou laboratoř pro přípravu živých pūd. V budoucnu má být zřízeno oddělení selekce producentů antibiotik a sbírka mikroorganismů, dále chemické oddělení pro výzkum struktury antibiotik. Práce ústavu je založena na širokém sběru antibiotických mikroorganismů, kterého se zúčastní síť hygienicko-epidemiologických stanic. Po izolaci antibiotické aktinomycety se nejdříve zjišťuje, zda již v ústavu bylo pracováno se získaným druhem aktinomycety. Pro tuto práci byl v ústavu vypracován rychlý klíč.*) Pro další práci se berou druhy antibiotických aktinomycet, s nimiž v ústavu dosud nebylo pracováno. Z účinných kmenů připravuje chemická skupina první koncentráty, u nichž se zjišťuje toxicita a souběžnost s aktivitou. Vhodné preparáty jsou dále čištěny a u vybraných látek se zkouší jejich chemoterapeutická účinnost na 12 typech bakterií, dále na viru chřipky, Ehrlichově ascitickém tumoru a na Crockerově sarkomu. U vhodných preparátů se dále sleduje jejich farmakologie. V poslední době se v ústavu pracuje na třech nových antibiotikách, která byla získána v krystalickém stavu: cerulomycin, heliomycin a krystalomycin.

Všesvazový výzkumný ústav antibiotik v Moskvě má tato základní oddělení a úkoly, které formuloval ředitel ústavu při naší návštěvě: 1. technologie antibiotik základních i nově uváděných do provozu; 2. nová antibiotika (ve spolupráci s Výzkumným ústavem nových antibiotik, G. F. Gauze); 3. selekce kmenů provokních i nových; 4. fyziologie producentů (podmínky fermentace, nové půdy, mechanismus biosyntesy, prekursorů); 5. chemické oddělení (chemie, fyzikální chemie, analytika, struktura antibiotik, výzkum metod izolace, chromatografie, měniče iontů atd.); 6. technologie aparatur a pokusné provozy (konstrukční oddělení a poloprovozy fermentační i chemické); 7. experimentální terapie (Z. V. Jermoljeva). Nové lékové formy, biologická kontrola, modelové infekční pokusy atd.; 8. oddělení nových antibiotik; 9. varna pūd; 10. hlavní mechanik; 11. dokumentační oddělení; 12. administrativa. Ústav má celkem 500 zaměstnanců (administrativa 37 zaměstnanců). Důležité úkoly, jako na př. nová antibiotika, selekce, fyziologie, analytika, chemie, technologie, mají nejméně 20 spolupracovníků. Vybavení ústavu je s hlediska aparaturového velmi dobré a účelné, i když ústav zatím není na všech úsecích vybaven tou nejmodernější aparaturou. Vedoucí činitelé však pokládají vybavení ústavu za podmínku prvořadě důležitosti, o čemž svědčí řada nových aparátů, které postupně získávají i z dovozu.

Z jednotlivých oddělení ústavu nás zvláště zaujalo oddělení selekce a hybridizace producentů antibiotik, vedené S. I. Alichanjanem, o níž jsme se zmínili výše. Oddělení je bohatě vybaveno personálně i technicky, pracuje na velmi dobré metodické úrovni a dosáhlo nesporných výsledků, které se uplatnily v praxi. V poslední době se snaží použít pro selekční práci zařízení z atomového reaktoru.

Při návštěvě ústavu si vyzádali spolupracovníci ústavu i delegace jednotlivých závodů referát člena čs. delegace (M. Herolda) o biologických podmínkách a technologii při fermentaci základních antibiotik, zvláště chlortetracyklinu. V rámci tohoto referátu byla uspořádána rozsáhlá diskuse, při níž byly vyměněny zkušenosti obou stran.

Dále byl shlédnut moskevský závod II. a na výslovnou žádost sovětské strany členové československé delegace (M. Herold, E. Bělík) navštívili závod I., kde se vyrábí chlortetracyklin (biomycin). Po prohlídce závodu byla s vedoucími referenty uspořádána diskuse o výtěžcích a technologii při výrobě tohoto antibiotika jak v SSSR, tak v Československu a sovětské straně byly sděleny podrobnosti, které umožňují vysoké výtěžky chlortetracyklinu.

Po skončení konference byla uskutečněna řada konkrétních jednání. Českoslovenští delegáti M. Herold a E. Bělík byli pozváni do výzkumných ústavů ministerstva zemědělství, kde byly podrobněji projednány otázky bezprostřední spolupráce na výrobě technických preparátů. Se sovětské strany bylo konstatováno, že metodika výroby technických preparátů antibiotických bude od československé strany v plném rozsahu přijata. Byl vyzádán materiál, týkající se výroby a použití antibiotik pro mimozdravotnické účely a technologie chlortetracyklinu pro odborný tisk (Herold-Málek, Herold-Bělík). Podrobně byl vyzádán přehled o čs. zkušenostech při použití chlortetracyklinu při výkrmu živočichů pro akademický časopis „Priroda“ (V. Škola, Z. Müller), práce o lymfotrofních antibiotikách (P. Málek) převzata pro časopis „Antibiotiki“, a řadou ústavů byly vyzádány podrobné údaje o našem československém postupu při výběru antibiotických aktinomycet (Ševčík a sp.).

Nejzávažnější jednání se uskutečnilo v podobě symposia na presidiu Akademie lékařských věd. Tam byly prodiskutovány formy a možnosti spolupráce mezi pracovníky a ústavy tábora socialismu na výzkumu antibiotik. Bylo dohodnuto, že bude pro to vytvořen stálý antibiotický komitét, který bude koordinovat veškerý výzkum antibiotický, organisovat výměnu zkušeností a dbát na dobré využití všech získaných poznatků, postará se o vytvoření sbírky antibiotických kmenů i standardů. Bylo dohodnuto, že sovětský časopis „Antibiotiki“ bude přeměněn na časopis mezinárodní. Budou pravidelně pořádána symposia, týkající se dílčích otázek výzkumu včetně výzkumu technologie. Byly dohodnuty i společné publikace knižní. Od československé strany byla převzata monografie Technologie antibiotik

*) G. F. Gauze, T. P. Preobraženskaja, J. S. Kudrina, N. O. Blinov, I. D. Rjabova, M. A. Svešnikova: „Voprosy klassifikacii aktinomicetov — antagonistov“. Moskva 1957.

(M. Herold), Antibiotika (M. Herold, M. Vondráček, J. Nečásek, J. Doskočil), bude převzata monografie P. Málka o použití antibiotik v chirurgii, perspektivně pak se počítá s monografií o metodice hledání nových antibiotik z Biologického ústavu ČSAV (Ševčík a sp.), o technologii výroby antibiotik pro zemědělství a potravinářství (M. Herold, E. Bělík) a použití antibiotik v zemědělství (Z. Müller). Bylo přijato, že příští konference, mající ráz spíše řady symposií, bude uspořádána v Československu.

Konference, jednání i návštěvy ústavů s konferencí spojené se tím staly dalším důležitým krokem pro rozvoj výzkumu i výroby antibiotik v zemích tábora socialismu.

*Ivan Málek, Eduard Bělík,
Miloš Herold, Prokop Málek, Vladimír Ševčík,
Vladimír Škola*

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 v červenci 1957. - A-01625

Издается Биологическим институтом Чехословацкой Академии наук в Издательстве Чсл. Академии наук. Выходит 6 раз в год. Заказы: Артия, Сметчки 30, Прага II, Чехословакия

СОДЕРЖАНИЕ

Шилганкова, Л.: Действие поверхностно-активных веществ на складчатые и гладкие формы дрожжей	193
Малек, И., Бургер, М., Геймова, Л., Ржичица, Я., Фенцл, З., Беран, К.: Ассимиляция сахаров и кислот при непрерывном производстве дрожжей на неразведенных сульфитных щелоках	203
Арпай, Я.: Селекционные работы с дифференцированными по весу конидиями грибка <i>Aspergillus terreus</i> Thom. I. Самопроизвольная неравноценность спор чистой культуры	213
Фенцль, З., Бургер, М., Беран, К.: Амилолитическая эффективность мицеллия плесени <i>Aspergillus niger</i> , отхода производства лимонной кислоты	221
Бомар, М.: К вопросу определения фунгитоксической эффективности фунгитоксических соединений. Испытания фунгитоксической активности подавления вегетативных форм микроорганизмов в культурах	228
Зайферт, Я.: Влияние поросли пихты (<i>Abies alba</i>) на биологическое состояние почвы	234
Шевчик, В., Подоил, М.: Ориентировочное определение ионного характера антибиотиков с помощью тестов на пластинках агара	238
Шевчик, В. и Вртишкова, А.: Проникновение антибиотиков через диализационную пленку на пластинках агара	242
<i>Краткие сообщения</i>	
Винтер, В.: Спорообразование у бацилл. V. Подавление цистином образования спор у некоторых представителей рода <i>Bacillus</i>	246
Лысенко, О.: Возможность переноса микробов через метаморфоз мотыля <i>Chironomus plumosus</i>	248
<i>Предварительное сообщения</i>	
Рокос, И., Прохазка, П.: Отношение метаболизма различных углеводов к продукции хлортетрациклина у штамма <i>Streptomyces aureofaciens</i>	251
<i>Хроника</i>	254

Published by Biologický ústav Československé akademie věd at Nakladatelství Čs. akademie věd. Yearly issue 6 numbers. Agents: Artia, Smečky 30, Praha II, Czechoslovakia

CONTENTS

Šilhánková, L.: The Effect of Surface Active Agents on Rough and Smooth Forms of Yeasts	193
Málek, I., Burger, M., Hejmová, L., Řičica, J., Fencl, Z. and Beran, K.: Assimilation of Sugars and Acids during the Continuous Fermentation of Undiluted Sulphite Waste Liquors	203
Arpai, J.: Selecting Conidia of the Mould <i>Aspergillus terreus</i> Thom. Differentiated according to Weight. I. Natural Inequality of Pure Cultures	213
Fencl, Z., Burger, M. and Beran, K.: The Amylolytic Effectiveness of the Waste Mycelium of the Mould <i>Aspergillus niger</i> from the Production of Citric Acid	221
Bomar, M.: Notes on the Determination of the Fungistatic Effect of Fungitoxic Compounds. Tests of Fungistatic Activity Inhibiting Vegetative Forms in Populations of Micro-organisms	228
Seifert, J.: The Influence of Silver Fir Stand (<i>Abies alba</i>) on the Biological State of the Soil	234
Ševčík, V., Podojil, M.: A Test for Determining the Ionic Character of Antibiotics by means of Agar Plates	238
Ševčík, V., Vrtišková, A.: The Permeation of Antibiotics through a Membrane for Dialysis on Agar Plates	242
<i>Brief Reports</i>	
Vinter, V.: Sporulation of Bacilli. V. Inhibition of Spore Formation by Cystine in Some Members of the Genus <i>Bacillus</i>	246
Lysenko, O.: The Possibility of Bacterial Transfer during the Metamorphosis of the Midge <i>Chironomus plumosus</i>	248
<i>Preliminary Communications</i>	
Rokos, J., Procházka, P.: The Relationship of the Metabolism of Different Carbohydrates in the Production of Chlortetracycline by <i>Streptomyces aureofaciens</i>	251
<i>News</i>	254