

Laboratoř pro speciální lékařskou mikrobiologii a imunologii
fakulty všeobecného lékařství KU, Praha

VLIV NĚKTERÝCH SUBSTRÁTŮ NA LIPIDY A MASTNÉ KYSELINY *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Влияние некоторых субстратов на липиды и жирные кислоты
у микробов *Listeria monocytogenes*

Action of Some Substrates on Lipids and Fatty Acids of *Listeria monocytogenes*

M. MÁRA, F. RATOČKA, B. BENEŠ

Technická spolupráce D. Adamcová

Выходы: Применительно к культуральной среде изучались количественные параметры содержания липидов и жирных кислот у четырех штаммов микробов *Listeria monocytogenes*, отличных по некоторым своим свойствам (патогенности в отношении мышей, продукции гемолизина, серотипу) (табл. 1).

В качестве питательных сред были использованы триптофанный бульон (TRY), бульон Тодда-Хьюитта (TH) и (или) триптический соевый бульон (TSB), к которым прибавляли 1% глюкозы или глицерина. В то время как после прибавления глицерина прирост бактериальной массы на всех указанных средах практически не меняется, глюкоза значительно повышает размножение бактерий. У всех изучавшихся штаммов после прибавления глюкозы общее содержание липидов при культивировании на средах TRY и TH колебалось в пределах от 5 до 7% количества бактериального сухого вещества (в среде TSB оно было существенно большим). После прибавления глицерина содержание липидов в сухом веществе повышалось примерно вдвое. Зависимость количества липидов от присутствия глицерина в среде является линейной в пределах от 0 до 2%. Прибавление глицерина к среде приводит также к повышению общего содержания жирных кислот в липидах. Их количество у трех из изучавшихся бактериальных штаммов составляло около 60% и при прибавлении глицерина повышалось на 5—10%; по данному параметру в отдельных штаммах обнаруживаются различия (см. табл. 2—5).

В целях определения влияния энергетических субстратов на содержание отдельных жирных кислот в липидах была использована бумажная хроматография в количественной модификации. Разделенные жирные кислоты, детектировавшиеся как медные мыла рубеанводородом, оценивались на фотоэлектрическом устройстве ERI 10. Установлено пониженное содержание жирных кислот, образующих наиболее толстое пятно смешания ($C_{14}:0$, $C_{15}:0v$, $C_{16}:1$) и повышенное содержание второго наиболее толстого пятна, образуемого жирными кислотами ($C_{16}:0$, $C_{17}:0v$, $C_{18}:1$) после прибавления глицерина к среде.

При детектировании тех же хроматограмм марганцовокислым калием (обнаружение ненасыщенных жирных кислот) отмечено снижение содержания пальмитоловой кислоты ($C_{16}:1$) и повышение содержания олеиновой кислоты ($C_{18}:1$). Использование данного метода исследования, хотя и менее специфичного и менее точного, чем газовая хроматография, позволило обнаружить два пятна жирных кислот с длинной углеродной цепочки, из которых по меньшей мере одно соответствует по своим свойствам мицелловой кислоте микробактерий.

Проведенное исследование установило существенные различия в содержании липидов и жирных кислот у разных штаммов микробов *Listeria monocytogenes*, выращиваемых в различных культуральных условиях. Данный факт требует дальнейшего изучения.

Г.

Summary: The authors studied quantitative parameters of the content of lipids and fatty acids in four *Listeria monocytogenes* strains differing from each other in their pathogenicity for mice, production of hemolisine and serotype. The parameters were followed up in dependence on cultivation medium.

For cultivation the authors used tryptose bouillon (Try), Todd-Hewitt broth (TH) respectively Tryptic Soya Broth (TBS) always with 1% of glucose or glycerol. Whereas growth of bacteria after addition of glycerol practically did not change in any media used, addition of glucose provoked their considerable increase. The total content of lipids on Try and TH media fluctuated in all strains under analysis between 5 and 7 % of dry matter when glucose was added. On TSB medium its content was considerably higher. Glycerol increased the percentage of lipids in bacterial dry matter roughly twice. Dependence of the quantity of lipids upon its presence in the medium is linear in the range from 0 to 2 %. Addition of glycerol to medium results also in the increase of the content of fat acids in lipids their total quantity fluctuating about 60 % in three out of four strains under study increasing thanks to glycerol by 5 till 10 %. Individual strains differ from each other as shown in tables 2—5.

In order determine the influence of energetic substrates upon individual fatty acids, the authors chose paper chromatography modified quantitatively. Separated fatty acids detected by rubeanic acid as copper soaps were evaluated on photoelectric-evaluator ERI 10. Addition of glycerol to medium was found to result in an increase of the content of fatty acids forming the most powerfull blend stain ($C_{14}:0$, $C_{15}:OB_r$, $C_{16}:1$) and an increase of the content of the second most powerfull stain formed by fatty acids ($C_{16}:0$, $C_{17}:OB_r$, $C_{18}:1$).

When detecting the same chromatogrammes by potassium permanganate (detection of unsaturated acids), the authors noted decrease of the palmitoleic acid ($C_{16}:1$) and increase oleic acid ($C_{18}:1$). Use of this method though less specific and less accurate than gas chromatography made it possible to prove the presence of two stains of fatty acids with long carbonaceous chain out of which at least one corresponds with its properties to mycolic acid of mycobacteria in paper chromatography.

The study revealed the fact that differences in the content of lipids and fatty acids in various *L. monocytogenes* strains were considerable under different cultivation conditions and required special study.

Ta

Čs. Epidem., 22, 1973, č. 1, s. 17—30.

Práce zabývající se lipidickými látkami v tělech *L. monocytogenes* jsou zhruba dvojího druhu. První z nich se zabývají izolací a fyziologickým účinkem některých frakcí lipoidní povahy na experimentální zvíře, druhé v podstatě analýzou lipidů a jejich složek, zejména mastných kyselin s ohledem na rozdíly ve složení látok u jednotlivých kmenev event. sérotypů, nebo zjištováním zvláštností ve složení lipidů u tohoto bakteriálního druhu. Do první skupiny náleží práce sledující fyziologický účinek Stanleyova chloroformového extraktu produkování monocytózu bílých myšek a nazvaného autorem MPA faktor (20).

Zatímco první pokračovatelé ve studiu Stanleyova objevu, v prvé řadě Stanley sám (21), a později Girard a Murray (6, 7) si všimli potencujícího účinku MPA na tvorbu protilátek proti komplexnímu bakteriálnímu antigenu; pozdější jako Tadayon, Carroll a Murray (23, 24) frakcionovali chloroformový extrakt na tenkých vrstvách a zjistili, že reakce je nejúčinnější ve fosfolipidické frakci reagující s ninhydrinem. Holder a Sword (1968) zjistili naproti tomu účinnost glyceridu A a povšimli si zvýšené glukoneogeneze, deprese inkorporace C^{14} alaninu do jaterního glykogenu a změn v obsahu jaterních steroidů po aplikaci MPA.

Čistě chemickou analýzou lipidů se zabýval Carroll a spol. (1968), kteří zjistili 6—7 % lipidů v sušině studovaného kmene *L. monocytogenes* po extrakci těl $CHCl_3 +$ metanol a určili poměr neutrálních lipidů (diglyceridy)

Tab. 1. Celkové lipidy *L. monocytogenes* kmen India na různých půdách
 Табл. 1. Общие липиды *L. monocytogenes* (штамм India) на разных средах
 Tab. 1. Total lipids of *L. monocytogenes*, India strain, on various media

Půda	Bakt. sušina mg/l		% lipidů v sušině	
	šarše	∅	šarše	∅
T. H.	28,1	34,0	6,0	6,1
	26,7		5,7	
	47,2		6,6	
T. H. + 1,5 % Glu	17,67	186,2	7,3	6,4
	194,8		5,8	
	187,1		6,0	
T. H. + 1,5 % Glyc	109,7	97,7	11,2	10,7
	47,6		10,3	
	96,0		10,3	
	137,4		10,2	
Try	9,4	19,2	6,0	6,1
	32,3		6,8	
	16,0		5,4	
Try + 1,5 % Glu	151,8	144,3	6,0	6,6
	190,5		6,1	
	127,1		7,1	
	107,6		7,2	
Try + 1,5 % Glyc	5,3	26,0	9,2	9,0
	12,1		12,4	
	14,0		9,9	
	72,5		8,1	
TSB	29,3	29,3	13,7	13,7
TSB + 1,5 % Glyc	33,6	33,6	16,7	16,7

k polárním (fosfolipidy fosfatidylglycerolového typu spolu s glykolipidy, obsahujícími glukózu a galaktózu), jako 1 : 4.

Analyzovali rovněž mastné kyseliny s výsledkem, že větvené i nerozvětvené C₁₆ a C₁₇ kyseliny tvoří 80 % totálních lipidů. Poměr těchto mastných kyselin ve frakcích se však lišil. Nejvíce se ve všech frakcích vyskytovala C₁₅:0 (55—60 %, ve fosfatidech B dokonce 71 %). V též roce publikoval Rains a spol. (1968) výsledky analýzy hydrolyzátů lipidů 33 kmenů *L. monocytogenes* plynovou chromatografií s průkazem celkem 16 mastných kyselin, jejichž procentuální zastoupení u jednotlivých kmenů kolísá tak, že vylučuje rozlišení mezi jednotlivými sérotypy *L. monocytogenes* a mezi *L. monocytogenes* a *L. grayi*. Složením odpovídají mastné kyseliny mastným kyselinám rodu *Propionibacteriaceae* (Bergery, 1966) a autor nenalezl žádné atypické jinde se nevyskytující mastné kyseliny.

Vzhledem k tomu, že autoři zejména těchto posledních prací použili kulтивace pouze na jednom druhu půdy (Tryptic Soy Broth), anebo pracovali s malým souborem kmenů, pokusili jsme se o analýzu celkového obsahu lipidů v sušině baktérií, jeho závislosti na kultivačním médiu a rozdílů u čtyř kmenů,

jež se svou virulencí v pokuse na myškách a produkci hemolyzinu podstatně lišily. Dále pak jsme studovali změny v obsahu celkových mastných kyselin, jakož i jejich procentuálního zastoupení v závislosti na použitém substrátu.

MATERIÁL A METODY

Kmeny

Listeria monocytogenes, kmen India izolovaný z případu adnátní listeriózy prof. Patočkou (dnes kolem 100 pasáží).

Kmen Bratislava 1 (K₁) izolovaný dr. Kohútem z ústavu mikrobiologie a imunologie LF ÚK v Bratislavě z případu granulomatosis infantiseptica.

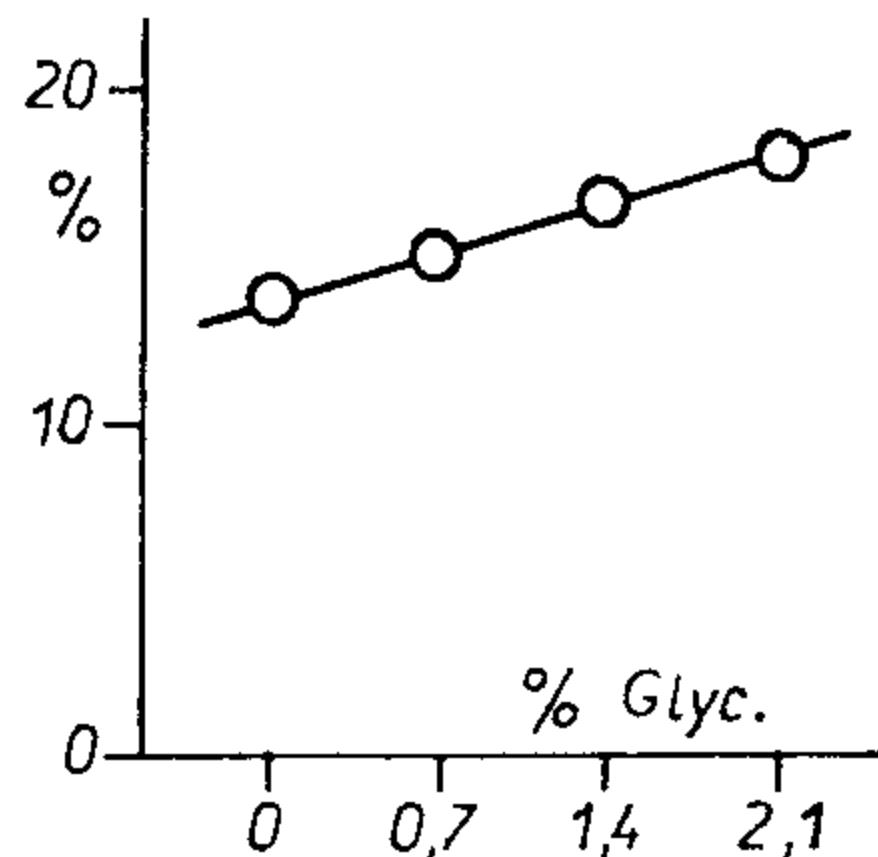
Kmen Bratislava 2 (K₂) izolovaný dr. Ivanovem v Bulharsku a zasláný dr. Donker-Voetovou z Utrechtu.

Kmen Bratislava 3 (K₃) izolovaný dr. Welshimerem z rostlin.

Všechny bratislavské kmeny byly zaslány laskavostí dr. Elischerové (Výzkumný ústav epidemiologie a mikrobiologie v Bratislavě).

Půdy

Toddův-Hewittův bujón (TH) laboratorně připravený z hovězích srdcí, Trypticová půda s 0,5% NaCl (Try) — Oxoid nebo Difco, Tryptic Soy Broth (TSB) — Difco nebo Oxoid.



Graf 1. Závislost tvorby lipidů u *Listeria monocytogenes* (kmen India) na množství glycerolu v půdě (TSB — Tryptic soy broth). Procenta lipidů na ose y jsou vztažena na sušinu baktérií

Диагр. 1. Зависимость образования липидов у *L. monocytogenes* (штамм India) от присутствия глицерина в среде (TSB-Tryptic soy broth). Процент липидов на оси y соотнесен к бактериальному сухому веществу

Fig. 1. The dependence of lipid formation in *Listeria monocytogenes* (India strain) on the amount of glycerol in medium (TSB — Tryptic soy broth). The percentage of lipids of y axis are related to the bacteria dry weight

K těmto základním půdám byly přidávány glukóza (Glu), event. glycerol (Glyc) v koncentraci 1,5 %. Pro stanovení závislosti množství lipidů na koncentraci glycerolu přidáván glycerol v koncentracích 0,7, 1,4 a 2,1 %.

Kultivace

Kmeny kultivovány staticky při 37 °C v neutrálních láhvích po 9 litrech, po dobu 72 hod. Po kultivaci byly baktérie autoklávovány (3) 30 min. při 1 at, centrifugovány a 5krát promyty destilovanou vodou. Potom byl promytý sediment těl suspendován v destilované vodě a sušen lyofilizací.

Extrakce lipidů

Lipidy extrahovány podle Girrarda a Beeaulieua (8) s upraveným množstvím rozpouštědla. 1—2 g přesně navážených lyofilizovaných buněk se rozmlékní v malém množství chloroformu v třecí misce, přenese do 500 ml baňky s kulatým dnem, spláchně

Tab. 2. Celkové mastné kyseliny L. monocytogenes kmen India na různých půdách
 Табл. 2. Общие жирные кислоты L. monocytogenes (штамм India) на разных средах
 Tab. 2. Total fatty acids of L. monocytogenes, India strain, on various media.
 Medium, % of lipids, % of fatty acids in lipids

Půda	% lipidu	% m. kys. v lipidech	\varnothing
T. H.	6,0	48	53,3
	5,7	50	
	6,6	62	
T. H. + Glu	7,3	64	54,5
	5,8	49	
	6,0	50	
T. H. + Gly	11,2	67	68,4
	10,3	64	
	10,3	68	
	10,2	75	
Try	6,0	50	57,0
	6,8	67	
	5,4	52	
Try + Glu	6,0	67	60,0
	6,1	58	
	7,1	60	
	7,2	55	
Try + Gly	9,2	65	65,0
	12,4	64	
	9,9	65	
	8,1	66	

kvantitativně 150 ml chloroformu a přidá balotino a skleněné kuličky. Ponechá se třepat v termostatu při 37 °C 24 hod. Filtruje se přes předem odmaštěný filtr Schleicherův-Schüllův a filtrát se uchová v lednici. Filtr s baktériemi se přenese znova

Tab. 3. Charakteristika čtyř studovaných kmenů L. monocytogenes

Табл. 3. Характеристика четырех изучаемых штаммов L. monocytogenes

Tab. 3. The characteristic of four studied strains of L. monocytogenes Strains of L. m., Serotype, LD₅₀ mouse i. p., Hemolysine 2.5 % sheep erythrocytes

Kmeny L. m.	Sérotyp	LD 50 myš i. p.	Hemolyzin 2,5% ber. erytr.
INDIA	1	$7,8 \times 10^6$	0
BRK ₁ T. 1	1	$2,6 \times 10^6$	0
BRK ₂ T. 2	5	$3,3 \times 10^6$	1/40
BRK ₃ T. 3	(4)	avirulentní	0

Tab. 4. Celkové lipidy *L. monocytogenes* u různých kmenůТабл. 4. Общие липиды *L. monocytogenes* у разных штаммовTab. 4. Total lipids of *L. monocytogenes* in different strains Strain, Medium, Bact. dry weight mg/1, % lipids in dry weight

Kmen	Půda	Bakt. sušina mg/l		% lipidů v sušině	
		šarše	∅	šarše	∅
INDIA	Try + Glu	151,8	144,3 ↘	6,0	6,6 ↘
		190,6		6,1	
		127,1		7,1	
		107,6		7,2	
	Try + Glyc	5,3		9,2	9,9 ↘
		12,1		12,4	
		14,0		9,9	
		72,5		8,1	
BRK ₁ T. 1	Try + Glu	159,2	145,9 ↘	4,8	5,4 ↘
		141,3		3,7	
		128,7		7,7	
	Try + Glyc	26,0		6,0	6,0 ↘
BRK ₂ T. 2	Try + Glu	138,0	138,0 ↘	5,0	5,0 ↘
		7,3		16,6	
	Try + Glyc	7,3		16,6	
		151,9	151,9 ↘	3,7	3,7 ↘
BRK ₃ T. 3	Try + Glyc	17,8		10,6	
		17,8		10,6	

do kulaté baňky a extrakce se opakuje se 60 ml chloroform-metanolu v poměru 2:1 po stejnou dobu za stejných podmínek. Po filtrace se opakuje ještě jednou a konečně ještě dvakrát s 50 ml chloroform-metanolu po dobu 2 hod. při pokojové teplotě bez třepání. Spojené filtráty I—V odpařeny ve vakuu za mírně zvýšené teploty do sucha a množství extrahovaných lipidů stanovenno vážkově po dosažení konstantní váhy. Procento lipidů v sušině vypočteno z naváženého množství lyofilizovaných bakteriálních těl.

Hydrolýza lipidů a stanovení celkových mastných kyselin

Mastné kyseliny získávány alkalickou hydrolýzou (nasycený roztok KOH v metanolu) přesně naváženého vzorku lipidů. Hydrolýza byla prováděna 8 hod. na vodní lázni v baňce pod zpětným chladičem. Po skončení hydrolýzy vzorek neutralizován 0,1N HCl na pH 2 a uvolněné mastné kyseliny vytřepány pětkrát do éteru, předem vysušeného bezvodým CaCl₂. Spojené éterové podíly byly po vysušení odpařeny do sucha a po opětovném vysušení nad fosforpentoxidem zváženy. Procento mastných kyselin počítáno vzhledem k navážce lipidů.

Chromatografie mastných kyselin na papíře

Mastné kyseliny nanášeny v množství 500 µg po rozpuštění v chloroformu na chromatografický papír Whatman 3 velikosti 24krát 16 cm impregnovaný parafínovým olejem (5% roztok parafínového oleje v éteru). Vyvíjení prováděno vzestupně 93% kys. octovou. Po důkladném vysušení při 60 °C byly celkové mastné kyseliny dete-

govány ve formě měďnatých solí (5% octan měďnatý 15 min.) rubeanovodíkem. Důležité je zejména důkladné, ne však přehnané vymytí nadbytku octanu měďnatého v tekoucí a destilované vodě před detekcí rubeanovodíkem. Osvědčilo se nám promytí trvající 3 hod. Omyté a usušené chromatogramy použity ke kvantitativnímu vyhodnocení na fotoelektrickém integračním přístroji ERI — 10 firmy Carl Zeiss Jena proti žlutému filtru.

Pro průkaz nenasycených mastných kyselin nanášeno stejné množství hydrolyzátu a vyvíjení prováděno rovněž stejným způsobem. Detekce prováděna ponořením do 0,5 % roztoku manganistanu draselného ve vodě a promýváním pod tekoucí vodou. Vzniklé hnědé skvrny hodnoceny na vyhodnocovači proti zelenému filtru, nebo vystřízeny a stanoveny vážením papíru.

K vyhodnocení je nutno zvolit start, na nějž je nanášen vzorek ve vzdálenosti 4 cm od kraje a celková délka chromatogramu je 18 cm. Po vyvinutí asi 2 cm pod okraj se chromatogram na čele odstřihne a vloží do přístroje. Nulování se provádí na bílé ploše chromatogramu před startem a integrace může tak zahrnout i skvrnu zůstávající na startu.

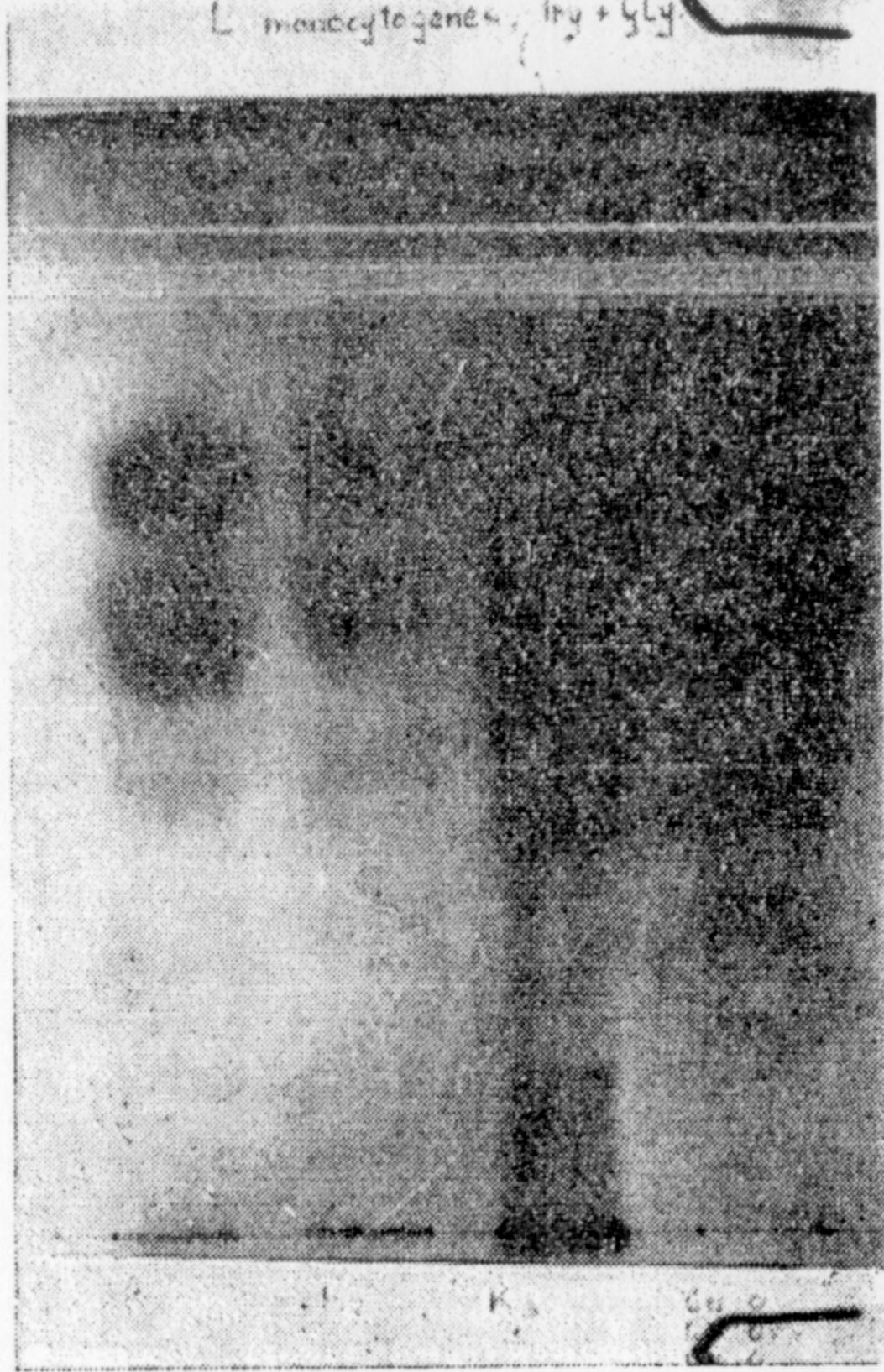
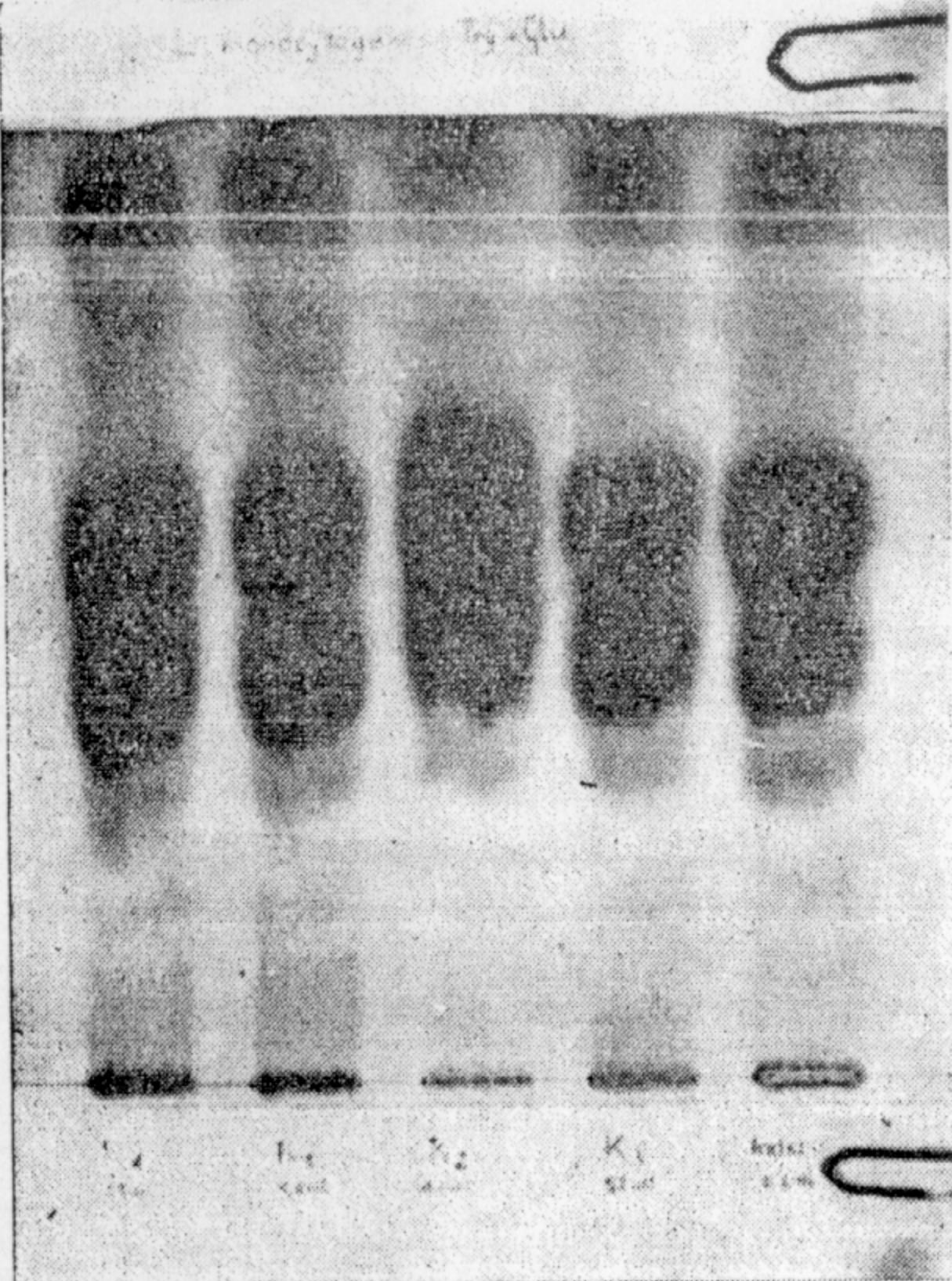
Každý vzorek byl chromatografován za přesně dodržených podmínek a stejně nanášce 5krát a relativní procenta jednotlivých mastných kyselin stanoveny z průměru. Statisticky stanovená chyba metody nepřesahuje 3 %.

Tab. 5. Celkové mastné kyseliny různých kmenů *L. monocytogenes*

Табл. 5. Общие жирные кислоты разных штаммов *L. monocytogenes*

Tab. 5. Total fatty acids of different strains of *L. monocytogenes* Strain, Medium, % of fatty acids

Kmen	Půda	% lipidů	% m. kyselin	\varnothing
INDIA	Try + Glu	6,0	67	
		6,1	58	
		7,1	60	
		7,2	55	
	Try + Glyc	9,2	65	
		12,4	64	
		9,9	65	
		8,1	66	
BRK ₁ T. 1	Try + Glu	4,8	73	
		3,7	53	
		7,7	71	
	Try + Glyc	6,0	73	
				65,6 → 73,0
BRK ₂ T. 2	Try + Glu	5,0	20	
			27	
	Try + Glyc	16,6	36	
			47	
				23,5 → 41,5
BRK ₃ T. 3	Try + Glu	3,7	45	
			68	
	Try + Glyc	10,6	62	
			67	
				58,3 → 67,0



Obr. 1. Papírový chromatogram mastných kyselin izolovaných z lipidů čtyř studovaných kmenů *L. monocytogenes* (K₁, K₂, K₃, India) kultivovaných na tryptózovém bujónu s glukózou (Try + Glu). — Obr. 2. Papírový chromatogram mastných kyselin izolovaných z lipidů tří studovaných kmenů *L. monocytogenes* (K₁, K₂, K₃) kultivovaných na tryptózovém bujónu s glycerolem (Try + Gly). Vpravo standardy mastných kyselin: C₁₂:0, C₁₄:0, C₁₆:0, C₁₈:0 (shora)

Рис. 1. Бумажная хроматография жирных кислот выделенных из липидов четырех изучаемых штаммов *L. monocytogenes* (K₁, K₂, K₃, India) культивированных на триптоznом бульоне с глюкозой (Try + Glu). — Рис. 2. Бумажная хроматография жирных кислот выделенных из липидов трех исследуемых штаммов *L. monocytogenes* (K₁, K₂, K₃) культивированных на триптоznом бульоне с глицерином (Try + Gly). Направо стандарты жирных кислот C₁₂:0, C₁₄:0, C₁₆:0, C₁₈:0 (сверху)

Pict. 1. Paper chromatogram of fatty acids isolated from lipids of the four studied strains of *L. monocytogenes* (K₁, K₂, K₃, India) cultivated on Tryptic broth with glucose (Try + Glu) — Pict. 2. Paper chromatogram of fatty acids isolated from the lipids of the three studied strains of *L. monocytogenes* (K₁, K₂, K₃) cultivated on Tryptic broth with glycerol (Try + Gly). On the right: the standards of fatty acids: C₁₂:0, C₁₄:0, C₁₆:0, C₁₈:0 (from above)

VÝSLEDKY

Tabulka 1 ukazuje nárůst baktérií vyjadřovaný v mg/litr bakteriální sušiny (vypočteno vždy z 9 litrů bujónové kultury) po kultivaci na různých půdách s eventuálním přídavkem energetických substrátů. Z tabulky je patrné zvýšení nárůstu po přidání glycerolu (zvláště na TH bujónu) a výrazné zvýšení ve všech případech po přidání glukózy.

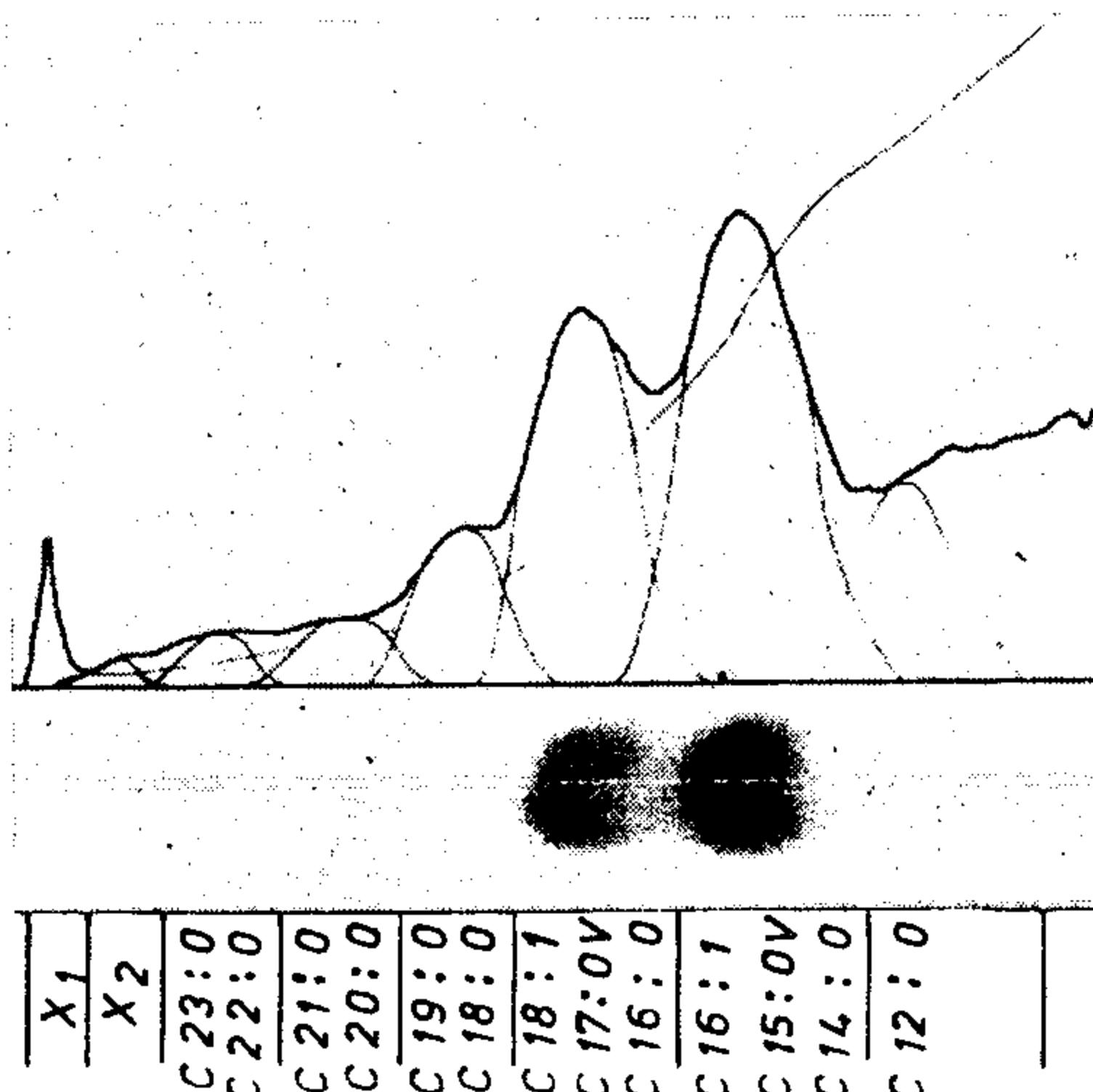
Tatáž tabulka ukazuje u stejných šarží celkový obsah lipidů v sušině vyjádřený v procentech. Zatímco zvýšení procenta lipidů na půdě s glukózou proti pouhému základnímu médiu je nevýznamné, jeví se v přítomnosti glycerolu velmi výrazné zvýšení procenta lipidů v bakteriální sušině. Z tabulky

je patrný relativně vysoký obsah lipidů u baktérií pěstovaných na TSB, jenž se přidáním glycerolu ještě dále lineárně zvyšuje, jak ukazuje tabulka a zjména graf 1.

Tabulka 2 ukazuje procento mastných kyselin v lipidech izolovaných z baktérií pěstovaných na různých půdách s přísadami energetických substrátů. Zatímco procento lipidů není přídavkem glukózy prakticky ovlivněno (u Try je vyšší než u TH), je možno pozorovat výraznější zvýšení procenta mastných kyselin v lipidech po přidání glycerolu do média.

Pro studium eventuálních rozdílů obsahu lipidů, procenta mastných kyselin v lipidech a různého procentuálního rozvrstvení mastných kyselin pomocí papírové chromatografie jsme si vybrali čtyři kmeny *L. monocytogenes*, jež se lišily, jak ukazuje tabulka 3, v sérotypu, v produkci hemolyzinu i ve virulenci pro myš vyjádřené ve formě LD₅₀ po i. p. aplikaci promyté kultury.

Další tabulka 4 ukazuje srovnání těchto čtyř kmenů v nárůstu a v procentu lipidů v bakteriální sušině po kultivaci na tryptosovém bujónu s glukózou, resp. s glycerolem. Z ní je patrno, že uvedené závislosti jsou v menší či větší míře platné pro všechny čtyři studované kmeny. Nárůst je na gly-



Graf 2. Papírová chromatografie mastných kyselin *L. monocytogenes* po zhodnocení vystříženého pásku na fotoelektrickém vyhodnocovači ERI 10. Pod chromatogramem vyznačeny mastné kyseliny vytvářející směsné skvrny. Skvrny souhlasí až na x₁ a x₂ s prací Rainese (17). C₁₆:0 značí nasycenou kyselinu (palmitová), C₁₇:ov značí nasycenou větvenou alifatickou kyselinu, a C₁₈:1 značí nenasycenou kyselinu s jednou dvojnou vazbou (kys. olejová)

Диагр. 2. Бумажная хроматография жирных кислот *L. monocytogenes* после оценки вырезанной полоски бумаги на фотоэлектрическом вычислите ERI 10. Под хроматограммой обозначены жирные кислоты образующие пятна смешения. Пятна согласуются за исключением x₁ и x₂ с данными статьи Райнеса (17) C₁₆:0 обозначает насыщенную кислоту (пальмитиновую), C₁₇:ov обозначает ненасыщенную кислоту с одной двойной связью (олейновая кислота)

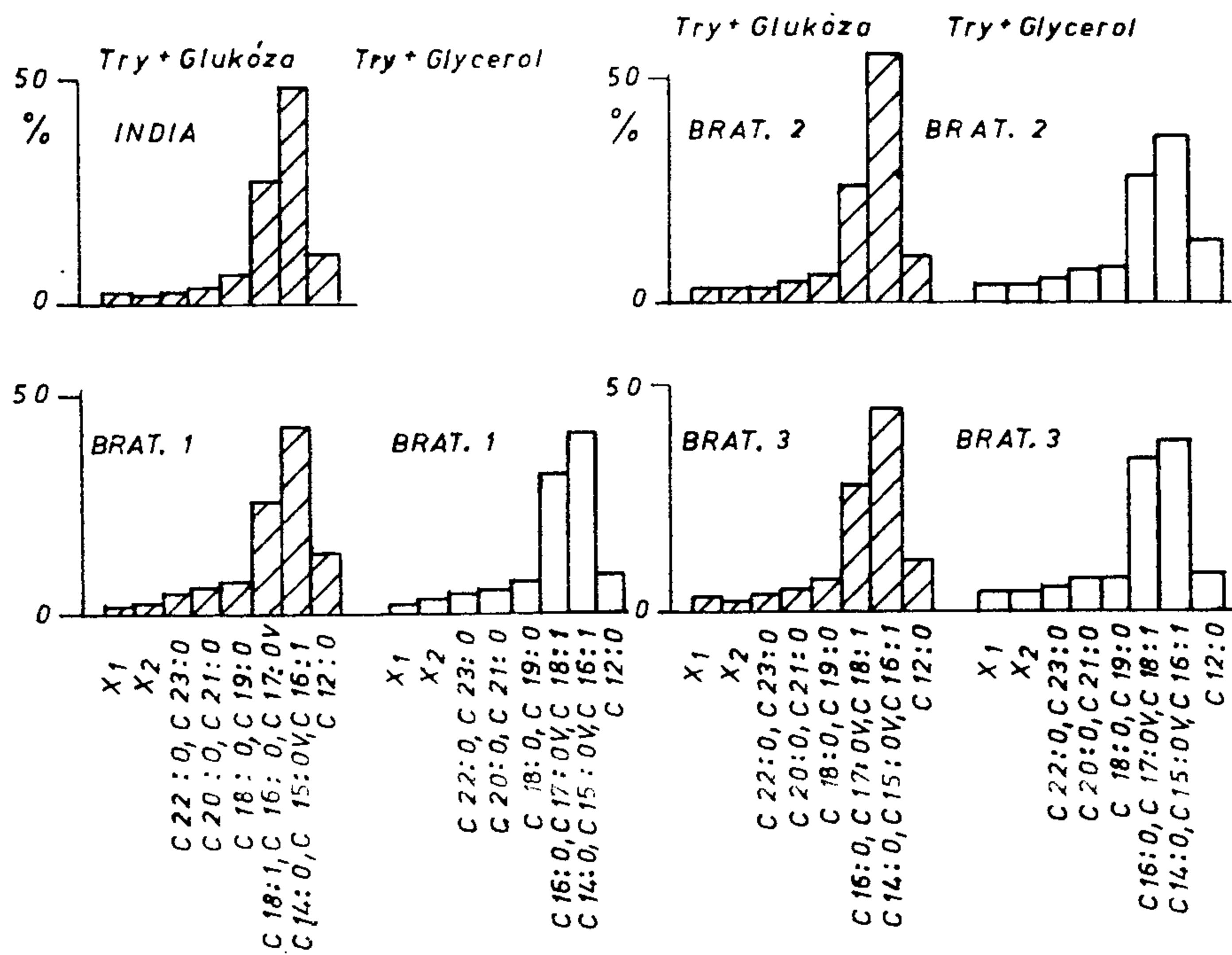
Fig. 2. Paper chromatography of fatty acids of *L. monocytogenes* aftes the evaluation of a bend cut-out on a photoelectric integrator ERI 10. Fatty acids forming the mixed spots are marked under the chromatogram. The spots correspond to the work of Raines (17) except of x₁ and x₂. C₁₆:0 indicates a saturated acid (palmitic acid), C₁₇:ov indicates a saturated ramified aliphatic acid, and C₁₈:1 indicates a saturated acid with one double bond (oleic acid)

cerinu podstatně menší (u většiny kmenů 5,5—8násobně, u kmene K₂ dokonce dvacetinásobně). Procento lipidů vzrůstá po přidání glycerolu ve všech případech nejvíce u kmenů K₂ a K₃, nejméně u K₁. Procento lipidů je zvláště nízké u kmene K₃ pěstovaném na tryptózovém bujónu s glukózou.

Tabulka 5 ukazuje procento mastných kyselin v lipidech studovaných čtyř kmenů na týchž půdách jako na předchozí tabulce. Ve všech případech procento mastných kyselin nepatrně stoupá (o 5—9 %), pouze u kmene K₂ je celkový obsah mastných kyselin podstatně nižší než u ostatních kmenů a zvýšení vlivem glycerolu dosahuje 18 %.

Na obrázcích 1 a 2 jsou fotografie papírových chromatogramů hydrolyzátů lipidů u studovaných kmenů. Mastné kyseliny jsou vyvýjeny jako celkové mastné kyseliny a jsou patrné rozdíly v obsahu některých z nich.

Ukázky zhodnocení těchto chromatogramů vidíme na grafu 2, kde jsou jednotlivé vrcholy označeny mastnými kyselinami, jež byly použity k řadě



Graf 3. Relativní procenta celkových mastných kyselin izolovaných z lipidů čtyř kmenů *L. monocytogenes* kultivovaných na tryptózovém bujónu (Try) s glukózou (plné sloupečky), resp. s glycerolem (prázdné sloupečky). Na ose y relativní procenta jednotlivých mastných kyselin. Kmen K₁ značen Brat. 1, K₂ — Brat. 2, K₃ — Brat 3

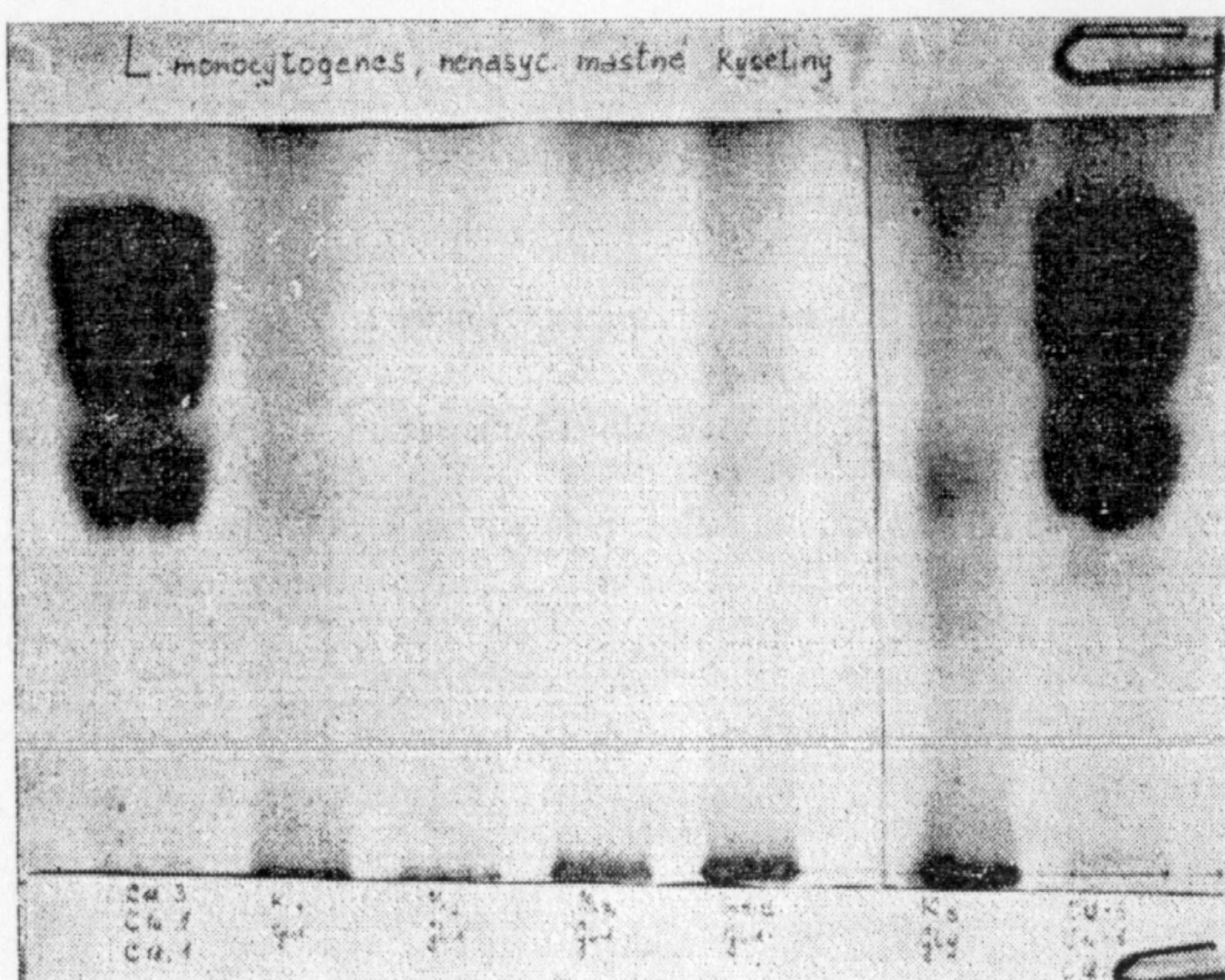
Диагр. 3. Относительный процент общих жирных кислот выделенных из липидов четырех штаммов *L. monocytogenes* культивированных на триптофном бульоне с глюкозой (сплошные столбцы), resp. с глицерином (пустые столбцы). На оси y относительный процент отдельных жирных кислот

Fig. 3. Relative percentage of total fatty acids isolated from the lipids of four strains of *L. monocytogenes* cultivated on the Tryptic broth (Try) with glucose (full columns) or with glycerol (empty columns). Relative percentage of individual acids are on y axis

pokusů jako standardy i těmi, které s nimi vytvářejí směsné skvrny a byly prokázány pomocí plynové chromatografie Rainesem (17).

Na grafu 3 je pomocí sloupečků vyjádřena situace u jednotlivých kmenů po kultivaci na tryptózovém bujónu s glukózou, resp. s glycerolem. Průměrné hodnoty vypočteny vždy z pěti stanovení. Graf ukazuje snížení obsahu mastných kyselin vytvářejících nejsilnější skvrnu ($C_{14}:0$, $C_{15}:0V$, $C_{16}:1^*$), u baktérií pěstovaných na glycerolu při současném zvýšení obsahu druhé nejsilnější skvrny tvořené mastnými kyselinami $C_{16}:0$, $C_{17}:0V$, $C_{18}:1$.

Tuto skutečnost potvrzuje obrázek 3, demonstруjící chromatografií hydrolyzátů lipidů čtyř kmenů pěstovaných na Try s glukózou ve srovnání s hydrolyzátem lipidů kmene Bratislava 3 na Try s glycerolem. Na tomto chromatogramu byly detegovány nenasycené kyseliny a zvýšení intenzity skvrny odpovídající nenasycené kyselině $C_{18}:1$ (olejová) proti ostatním čtyřem hydrolyzátům, ale i snížení skvrny odpovídající kyselině $C_{16}:1$ (palmitoolejová) zvláště proti kmeni India je na obrázku patrné.



Obr. 3. Papírový chromatogram nenasycených mastných kyselin z lipidů čtyř kmenů *L. monocytogenes* (K_1 , K_2 , K_3 , India) po kultivaci na tryptózovém bujónu s glukózou (Try + Glu) a u kmene K_3 po kultivaci na tryptózovém bujónu s glycerolem (Try + Gly). Po okrajích standardy mastných kyselin shora $C_{18}:3$ (linolenová), $C_{16}:1$ (palmitoolejová), $C_{18}:1$ (olejová)

Рис. 3. Бумажная хроматография ненасыщенных жирных кислот из липидов четырех штаммов *L. monocytogenes* (K_1 , K_2 , K_3 , India) после культивирования на триптофном бульоне с глюкозой (Try + Glu) и у штамма K_3 после культивирования на триптофном бульоне с глицерином (Try + Gly). На краях стандарта жирных кислот сверху $C_{18}:3$ (линооленовая), $C_{16}:1$ (пальмитолевая), $C_{18}:1$ (олеиновая)

Pict. 3. Paper chromatogram of unsaturated fatty acids from lipids of four strains of *L. monocytogenes* (K_1 , K_2 , K_3 , India) after the cultivation on Tryptic broth glucose (Try + Glu) and in the strain K_3 after cultivation on Tryptic broth with glycerol (Try + Gly). The standards of fatty acids on the sides are from above: $C_{18}:3$ (linolenic acid), $C_{16}:1$ (palmitoleic acid), $C_{18}:1$ (oleic acid)

* Symbolika: $C_{15}:0V$ označuje počet atomů uhlíku : počet dvojných vazeb. V značí větvení řetězce.

Z našich výsledků vyplývá, že celkový obsah lipidů zjištěný Carrolem a spol. (3), tj. 6–7 % bakteriální sušiny, jsme při použití běžných kultivačních půd prokázali i my. Vysoký obsah lipidů po kultivaci kmenů *L. monocytogenes* na TSB však ukázal, že i složení základního média může ovlivňovat kvantum lipidů v bakteriální sušině. Zvýšení růstu po přidání energetických substrátů bylo u *L. monocytogenes* již dávno známo. Z našich pokusů vyplývá, že přidání glukózy nemá podstatný vliv na obsah lipidů v buňkách tohoto mikroba. Glycerol, jakožto náhradní energetický substrát, zvyšuje rovněž nárůst baktérií proti základnímu médiu, i když zdaleka ne tak výrazně. Naproti tomu významně zvyšuje obsah lipidů, a to zhruba dvojnásobně.

Účinek glycerolu na produkci lipidů u baktérií byl poprvé popsán Larsonem a Larsonem (12) u *E. coli*, *Staf. albus*, *B. mucosus*, *B. megatherium*. Přidání glukózy zvyšovalo procento lipidů v sušině jen u posledně jmenovaného bakteria, glycerol však zvyšoval obsah lipidů velice podstatně (až čtyřnásobně u všech jmenovaných mikrobů). U *Cor. diphteriae* si podobného vlivu kultivačního média na obsah lipidů povšiml Čmelík (5).

Tato skutečnost doznala největšího uplatnění u kultivace mykobaktérií, kde glycerol nejen zvyšuje množství lipidů v závislosti na svém množství v médiu, ale svou přítomností v Sautonově médii umožňuje povrchový růst v blance a je jediným zdrojem uhlíku pro tyto baktérie. Vlivu glycerolu na syntézu lipidů si povšiml první Chargaff (4) a později se touto otázkou zabývala ještě řada autorů, z nichž jmenujeme zejména Rzucidla a spol. (18) a Portelance a Paniseta (16), kteří se zabývali vztahem mezi glukózou a glycerolem v médiu, dále Pokorného a spol. (15), kteří sledovali rozdíly v obsahu lipidů u virulentních a avirulentních mykobaktérií. Řada prací se zabývá ovlivněním koncentrace lipidů v tělech baktérií, např. délkou kultivace (1), vlivem některých tuberkulostatik (19), nebo náhradou asparaginu v Sautonově médii kaseinhydrolyzátem a vlivem lyofilizace inokula na obsah lipidů (13 aj.).

Zvýšení obsahu lipidů u listerie vlivem glycerolu je výrazné a poukazuje spolu se zjištěnými rozdíly v chemickém složení baktérií u různých kultivačních médií na možnost kvalitativních rozdílů ve složení lipidů za různých kultivačních podmínek. Zvýšení procenta lipidů není u všech kmenů stejné, největší je u kmenů s nejnižším obsahem lipidů na Try s glukózou.

Procento celkových mastných kyselin v lipidech se zdá být poněkud nižší než u mykobaktérií, kde ovšem rovněž závisí na kultivačním médii (13). U všech čtyř kmenů glycerol jejich kvantum zvyšuje.

Zajímavý je nízký obsah mastných kyselin v lipidech u kmene K2. Použitá gravimetrická metoda není však příliš přesná, a proto nelze podle kolísajících výsledků soudit na příčiny rozdílných výsledků u jednotlivých šarží. Průměry nám však dovolují domnívat se, že i zde je glycerin potencujícím faktorem a mění celkové složení lipidů, nejen tedy pouze jejich celkové množství v bakteriální sušině.

Takto naznačené kvantitativní rozdíly v jednotlivých lipidických složkách vystupují ještě více při posuzování kvantitativního vyhodnocení chromatogramů hydrolyzátů lipidů. Papírová chromatografie není za použití vyhodnocovače tak přesnou metodou, jako je plynová chromatografie a navíc není touto metodou možno rozdělit nasycené a nenasycené mastné kyseliny při jednom dělení. K tomu účelu je nutno použít paralelního dělení a dvou detekcí. Nedostatkem metody je i nemožnost oddělení mastných kyselin o lichém počtu uhlíků a kyselin rozvětvených (izomerních). Výhodou je však

vedle snazší dostupnosti metody i možnost detekce mastných kyselin o vyšším počtu uhlíků než C₂₆, což je pro jejich vysoké body varu plynovou chromatografií nemožné. Z těchto důvodů je uvedená metoda vhodná zejména pro analýzu mykobakteriálních mastných kyselin, tj. zejména pro přítomnost kyselin mykolových a v našem případě i pro analýzu lipidů u *L. monocytogenes*.

Reines a spol. (17) zjistili plynovou chromatografií hydrolyzátů listeriových lipidů u 33 kmenů celkem 15 mastných kyselin (nejvyšší C₂₃:0). Mezi těmito se nachází jeden vrchol mastné kyseliny blíže neurčené povahy o nízkém počtu uhlíků, ale mezi ostatními nebyla prokázána žádná atypická kyselina. Námi provedenou analýzou jsme vedle šesti skvrn, jež podle standardů a známých R_F mastných kyselin lze konfrontovat i co do kvantitativního zastoupení s nálezy Rainese a spol., našli pravidelně se vyskytující, neznámé dvě skvrny na startu, odpovídající podle našich zkušeností svou polohou na chromatogramu mykolovým kyselinám nalezeným až dosud pouze u mykobaktérií, difterických korynebaktérií a nocardii. Pravděpodobný význam mykobakteriálních mykolových kyselin, vyskytujících se převážně ve vazbě se sacharidy jakožto přídatný faktor virulence ve fyziologicky účinných frakcích lipidů (vosky D, Cord faktor, PMKo faktor) je všeobecně předpokládán. Existují též práce o toxicém významu α,α -trehalozo-dicorynemykolátu izolovaného Ionedou a spol. (10) z *Cor. difteriae* (11). Proto může mít i tento náš nález svůj význam nejen z hlediska obecné mikrobiologie, ale snad i virulence *L. monocytogenes*.

Z kvantitativního hodnocení chromatogramu vyplývá vliv glycerolu v kulturním médiu na složení mastných kyselin. U všech srovnávaných kmenů je patrný pokles v obsahu nejvýraznější skvrny obsahující kyseliny myristovou, palmitoolejovou a C₁₅:0 a zvýšení obsahu druhé nejsilnější skvrny obsahující kyseliny palmitovou, olejovou a C₁₇:0V. Nejvyšší výskyt právě těchto kyselin souhlasí dobře s nálezy Rainese a spol.

Tento fakt získaný vyhodnocením série chromatogramů byl potvrzen chromatografií mastných kyselin a detekcí nenasycených kyselin, kde mezi pěti skvrnami vyniká na první pohled výrazné zvýšení kyseliny olejové při nezvýšeném obsahu kyseliny palmitoolejové u kmene K₃ pěstovaného na půdě s glycerolem proti témuž na půdě s glukózou. I na těchto chromatogramech se ukazují skvrny obdobné mykolovým kyselinám.

Zjištění týkající se mastných kyselin C₁₂:0—C₂₃:0 hodláme upřesnit jejich stanovením pomocí plynové chromatografie, a to u kmenů s rozdílnou virulencí a produkcí hemolyzinu (14), jenž je jediným dosud známým faktorem virulence listerií, za různých kulturních podmínek. Nález kyseliny mykolové, event. více těchto kyselin s dlouhým alifatickým řetězcem nutno přirozeně prokázat jejich izolací, chemickou a spektrální analýzou.

Z Á V Ě R

1. Celkový obsah lipidů *L. monocytogenes* na Try a TH půdách se pohybuje mezi 5—7 % sušiny, na TSB je značně vyšší. Glukóza zvyšuje nárůst, ale na obsah lipidů v sušině nemá vliv.

2. Glycerol zvyšuje množství bakteriální masy jen mírně, ale výrazně podporuje tvorbu lipidů. Tato závislost na jeho koncentraci v půdě je lineární, v rozmezí od 0 do 2,1 %.

3. Glycerol zvyšuje rovněž procento mastných kyselin v lipidech. Glukóza je bez efektu.

4. Kvantitativním zhodnocením papírových chromatogramů zjištěno zvýšení kyseliny olejové a pokles kys. palmitoolejové pod vlivem glycerolu.

5. Papírovou chromatografií detegovány dvě mastné kyseliny s dlouhým řetězcem odpovídajícím svým R_F mykoloovým kyselinám.

6. Všechna fakta byla nalezena u všech studovaných kmenů, mezi jednotlivými kmeny byly nalezeny kvantitativní rozdíly. Diskutován vztah obsahu lipidů k virulenci studovaných kmenů.

LITERATURA

1. Asselineau, J.: Sur la variation de la teneur en lipids du bacille tuberculeux en fonction del age de culture. Ann. Inst. Pasteur, 81, 1951, s. 306. — 2. Buchanan, R. E., Holt, J. G., Lessel, Jr., E. F.: Index Bergeiana. Baltimore, Williams and Wilkins 1966, s. 837. — 3. Carroll, K. K., Cutts, J. H., Murray, R. G. E.: The lipids of Listeria monocytogenes. Canad. J. Biochem., 46, 1968, s. 899. — 4. Chargaff, E.: Zur Chemie der Bakterien, Über die Lipide der Diphtheriae Bakterien. Hoppe-Seyler Z. physiol. Chemie, 201, 1931, s. 191, 198. — 5. Čmelík, S.: Über den Einfluss verschiedener Nahrungsmittellösungen auf die Verteilung der Lipide von C. diphtheriae. Schweiz. Z. alg. Path., 17, 1954, s. 289. — 6. Girard, K. F., Murray, E. G. D.: Listeria monocytogenes as the cause of disease in man and animals, and its relation to infectious mononucleosis from an etiological and immunological aspect. Amer. J. Med. Sci., 221, 1951, s. 343. — 7. Girard, K. F., Murray, E. G. D.: The influence of a sustained monocytosis upon the antibody response in rabbits to various antigens. Canad. J. Biochem., 32, 1954, s. 1. — 8. Girard, K. F., Beaulieu, M.: Some factors affecting the yield of the monocytosis-producing agent. Canad. J. Microbiol., 9, 1963, s. 473. — 9. Holder, I. A., Sword, C. P.: Characterization and biological activity of the monocytosis producing agent of Listeria monocytogenes. J. Bact., 97, 1969, s. 603. — 10. Ioneda, T., Lenz, M., Pudles, J.: Chemical Constitution of a glycolipid from C. diphtheriae P.W.8. Biochem. biophys. Res. Commun., 13, 1963, s. 110. — 11. Kato, M.: Action of toxic glycolipid of Corynebacterium diphtheriae on mitochondriae structure and function. J. Bact., 101, 1970, s. 709. — 12. Larson, L. W., Larson, W. P.: Factors governing content of Bacteria on the influence on pellicle formation. J. infect. Dis., 31, 1922, s. 407. — 13. Mára, M., Galliová, J., Hejlová, E.: Vliv kulti-

vačních podmínek na chemické složení pražského a kodaňského BCG kmene. Stud. pneumol. phtiseol. czechoslov., 31, 1971, s. 196. — 14. Njoko-Obi, A. N., Jenkins, E.: Quantitative aspects and nature of soluble hemolysins of L. monocytogenes. Bact. Proc., 1962, s. 77. — 15. Pokorný, J., Šalanská, V., Šulová, J.: Srovnávací studie lipidů virulentních a avirulentních mykobakterií. Čas. Lék. čes., 1962, č. 2. — 16. Portelance, V., Paniset, M.: Studies on Mycobacteria. Rev. canad. Biol., 16, 1957, s. 112. — 17. Raines, Lynda, J., Moss Wayne, C., Farstchi, D., Pittman, B.: Fatty acids of Listeria monocytogenes. J. Bact., 96, 1968, s. 2175. — 18. Rzucidlo, L., Stachow, A., Ziolecher, J.: Le contenu des fractions lipoidiques dans le vaccin BCG (souche tille Morreau). Symposium International BCG, Warszawa, 1959. — 19. Russe, H. P., Barclay, W. R.: The effect of isoniazid on lipids of tubercle bacillus. Amer. Rev. Tuberc., 72, 1955, s. 713. — 20. Stanley, N. F.: Studies on Listeria monocytogenes I. Isolation of a monocytosis producing agent (MPA). Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 27, 1949, s. 123, 133. — 21. Stanley, N. F.: Studies on L. monocytogenes III. The failure to isolate the organism from the human throat. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 28, 1950, s. 117. — 22. Stanley, N. F.: The augmenting action of lecithin and the lipoids of Aspergillus fumigatus and L. monocytogenes in antibody production using Salmonella typhimurium as an antigen. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 28, 1950, s. 109. — 23. Tadayon, R. A., Carroll, K. K., Murray, R. G. E.: Purification and properties of biologically active factors in lipid extracts of Listeria monocytogenes. Canad. J. Microbiol., 16, 1970, s. 535. — 24. Tadayon, R. A., Carroll, K. K., Murray, R. G. E.: Factors affecting the yield and biological activity of lipid extracts of Listeria monocytogenes. Canad. J. Microbiol., 15, 1969, s. 421.

M. M., Praha 2, Studničkova 7