

Z bakteriologicko-serologického ústavu Karlovy university v Praze.

---

# NOVÉ KULTIVAČNÍ MOŽNOSTI STRIKTNĚ ANAEROBNÍCH MIKROBŮ.

(Zavedení nového principu pro kultivaci anaerobů.)

## Un nouveau procédé de culture des anáerobies strictes

(par l'addition des substances chimiques réductrices, ajoutées au milieu de culture).

Doc. Dr. F. PATOČKA.

*Zvláštní otisk*

*z „ČASOPISU LÉKAŘŮ ČESKÝCH“*

*čís. 41—43, roč. 1937.*



V PRAZE 1937.

NÁKLADEM VLASTNÍM. TISKEM Dr. ED. GRÉGRA A SYNA V PRAZE.

Svoí nezapomněatelné hoke sepsal a věnuje  
jějí H.

Zvláštní otisk z Časopisu lékařů českých č. 41—43, r. 1937.

## Nové kultivační možnosti striktně anaerobních mikrobů.

(Zavedení nového principu pro kultivaci anaerobů.)

Doc. Dr. F. PATOČKA.

Z bakteriologicko-serologického ústavu Karlovy univer-  
sity v Praze.

Jak známo, jest kyslík prvkem, který hluboce poruší vitalitu buňky všech mikrobů striktně anaerobních, při čemž ovšem stupeň citlivosti na něj u vyspělého mikroba je druhově velmi rozdílný; avšak u všech mikrobů této kategorie projeví se toxický a inhibiční účinek kyslíku maximálně při pomnožování. Při důkladné rozvaze o podstatě tohoto zjevu vidíme, že podstatný rozdíl mezi tak zv. mikroby aerobními a tak zv. mikroby striktně anaerobními (kteréžto názvy ve světle novějších pozorování nejsou naprostě výstižné) spočívá v tom, že poslední nejsou schopny používat přímo vzdušného kyslíku k účelům oxydačním, a tím k získání pro život potřebného množství energie, aniž by při tom nebyly hrubě poškozeny. Jsou tedy nuceny opatřovati si ji pochody redukčními a jelikož jsou tyto u živých bytostí poměrně méně výdatným pramenem energie, než-li oxydace pomocí kyslíku, mohli bychom je na první pohled pokládati za jakési přírodní mutiláty. Skutečně také po stránce biochemické byl u všech prokázán naprostý nedostatek dýchacích substrátů, zejména těch, které obsahují železo. Jediný z anaerobů, ostatně i podle starších zkušeností právem počítaný mezi nejméně citlivé na kyslík, clostridium butyricum, chová oxydační

barvivo, a to tak zv. flavin. Je tedy pravděpodobné, že jediný tento mikroorganismus může — zcela výjimečně — alespoň z části získávat energii způsobem charakteristickým i pro mikroby aerobní. Nedostatek dýchacích fermentů samozřejmě ovšem neznamená, že by kyslík byl elementem, který by vůbec nemohl vcházeti ve spojení s buňkou anaerobního mikroba. O jaké spojení kyslíku s buňkou zde běží, není zatím známo, ale určitá jeho spotřeba byla u méně přísných anaerobů s určitostí zaznamenána dokonce i ve stavu klidovém, a ostatně jeho jedovatý účinek si ani jinak nedovedeme představiti, nežli tak, že se pevně váže na jejich plasma. Jsou tedy anaerobům výhody oxydace kyslíkem neznámy, což nás vede k zajímavé dedukci (Frei), že anaeroby jsou živými organismy geneticky staršími nežli mikroby aerobní, t. j., že mohly vzniknouti na chladnoucí zemi ještě v té době, kdy v atmosféře nebyl dostatek kyslíku. Přirozeně, jako ostatní živé bytosti obsahují anaeroby téměř všechny známé druhy dehydráz, tím energičtěji účinkujících, že jim musí pomoci nahraditi energetický schodek, zaviněný popsanou neschopností oxydační. Jestliže však opět prostudujeme pečlivě poměry, za nichž se anaeroby v přírodě nejčastěji vyskytují, a zamyslíme-li se nad nesmírně důležitou úlohou, která jim byla v přírodě přidělena a bez níž by již dávno život na zeměkouli nebyl možný, t. j. obstarávání tak zv. hnileb a tlení, tu vidíme, že jejich zdánlivý defekt se ukáže vlastně býti výhodou, neboť v hloubkách odpadových vod a uvnitř mrtvol rostlinných, zvířecích a lidských není takový dostatek kyslíku, který je nutný mikrobu aerobnímu k udržení jeho energetické rovnováhy a tudíž i života.

Tím jsme již naznačili, že poměry pro pomnožování aerobů i mikrobiů anaerobních v přírodě

mohou býti nesmírně různé a příznivější buď jedné, nebo druhé skupině. Vyjádřeno chemicky, lze vhodnost takového prostředí pro vznik mukrobiální hodnotit vzájemným kvantitativním poměrem látek redukčních a oxydujících. Tam, kde převládají chemické pochody redukční, je dána možnost anaerobního života, jevíci se převahou mikrobů anaerobních. V případě opačném převládá flora aerobní. Kdežto však poměry v přírodě jsou nesmírně komplikované a nepřístupné jednoduchému kvantitativnímu vyjádření, naskytá se nám možnost studovati vzájemný poměr substancí redukčních k oxydačním v umělých kulturách, kde je situace mnohem jednodušší. Tento vzájemný poměr látek oxydačních i redukčních označujeme jako redoxpotencial kultivační půdy a snažíme se jeho výši určiti měřením elektrického napětí jimi vyvolaného, které se vyjadřuje v milivoltech a udává nám hodnoty buď pozitivní, nebo negativní, porovnáno s normální vodíkovou elektrodou. Tento faktor intensity, který nám ukazuje okamžitou pohotovost určitého prostředí k pochodu oxydačním, nebo redukčním, bývá označován jako Eh a je závislý dále na temperatuře a Ph měřené látky. K vůli zjednodušení lze hodnoty Eh, určené v milivoltech a tedy numericky nepřehledné, přepočítati na cifru tak zv. rH (analogické Ph při určování volných voltů vodíkových, nebo hydroxylových) jako symbol, vyjadřující intenzitu reakce určitého oxyredukčního systému, který má rovněž hodnoty + nebo -). Na př. limitní redoxpotencial kultur bacila tetanu při 37° C a pH 7·1 jest Eh = -0·265 volt (což = rH 5·5). Redoxpotencial kultivační půdy, vyjádřený určitou hodnotou Eh, po případě rH před naočkováním, mění se rychle po naočkování během vzniku mikrobů. Mezi první, kteří se obírali měřením elektromotorických sil při redukčních po-

chodech mikrobů, souvisících s jejich vzrůstem, byl Potter a později Gillespie, který zjistil, že potencial při vzrůstu *bacteria coli* progresivně klesá. Dokonalé vědecké base dostalo se studiu těchto sil pracemi Wurmserovými, který dokazuje, že veškerý mikrobiální vzrůst může být po-važován za oxydoredukční fenomen a že naopak oxydoredukční potencial prostředí ovlivňuje podstatně nejrůznější synthetické pochody mikrobiel-ního metabolismu. Pro mikroby striktně anaerobní specielně (vyzkoušeno na bac. *sporogenes*) bylo nalezeno, že přítomnost kyslíku nebo per-oxydu vodíku i v nepatrných dávkách v bouil'onu, vyvolává dlouhou latenci vzrůstu uvedeného bacila, aniž by byl tento přímo usmrcován. Tato latence vzrůstu odpovídá přesně době, kterou uvedený anaerob potřebuje k tomu, aby produkcí vlastních redukčních látok, zejména asi sloučenin sulfhydrilových, upravil redukční potencial kultivačního prostředí na hodnotu, ku svému vzrůstu potřebnou. Proto je také velmi snadno možné onu vzrůstovou latenci snížit na minimum předběžným přidáním nejrůznějších redukčních látok, jak o nich níže bude řeč. Oxydoredukční potensial, jakožto míra okamžité intenzity redukčních pochodů, není ovšem jediným měřítkem vhodnosti určitého prostředí pro kultivaci anaerobních mikrobů. Druhým jest určení celkové kapacity redukčních procesů, která se dá změřiti množstvím kyslíku, spotřebovaného k úplné oxydaci všech redukčních látok v prostředí obsažených. Praktická zkušenost ukázala, že určování oxydoredukčního potenciálu je mnohem snazší, takže se ho již téměř všeobecně u kultur anaerobů používá, tím spíše, že bylo jednou pro vždy uznáno, že stanovení jeho hodnoty má pro tento druh mikroorganismů stejný význam, jako určování a do-držování jistých mezních hodnot pH pro veškeré

mikroby vůbec. Jednou z fundamentálních prací, obírajících se určením redoxpotencialu při vzrůstu striktně anaerobních mikrobů, je publikace Plotzova a Gelosova, kteří pracovali technikou velmi exaktní, jedině vhodnou pro podobný fyzikálně-chemický výzkum, t. j. ve vakuu. Souhrnem dokazují, že optimum iniciálního vzrůstu anaerobních mikrobů může být u různých druhů mikrobů různé a kolísá kolem  $rH = 14$ ; platí pro pH kultivační půdy 7·1, měřeno ve vakuu při 37° C. Přibližně za jednu hodinu vzrůstu klesne potenciál naočkovaného bouillonu na  $Eh = 0\cdot130$  volt (odpovídá  $rH = 10$ ), což znamená počátek pomnožování bakteriálního. V dalších hodinách potenciál rychle klesá až k  $rH = 7\cdot8$ , poté klesá pomaleji až k hodnotě  $rH = 5\cdot5$  ( $Eh = -0\cdot265$  volt). Tato hodnota odpovídá maximu kultury a na ní se bouillon drží v průběhu dalších 7 kultivačních dnů, t. j. pokud vůbec bylo měřeno. Nejzajímavějším faktem jejich pozorování je to, že při dosažení maxima kultury všechny zkoušené druhy anaerobních mikrobů upravily svůj potencial na hodnotu přibližně  $rH = 5\cdot5$ , takže tato limitní hodnota není charakteristickou pro jednotlivé druhy anaerobních mikrobů. Bylo-li v experimentu dosaženo dalšího umělého snížení redukčního potencialu (natriumsulfitem) na hodnoty  $Eh = -0\cdot497$  volt, t. j.  $rH = -2$ , zůstává vzrůst anaerobů stejně latentní, jako když byl zvýšen přes  $rH = 15$ . Při srovnávacích pokusech se pak zjistilo, že anaeroby při svém vzrůstu podmiňují stejný pokles elektrického potenciálu, jaký vznikal, byl-li bouillon za stejných podmínek po stejnou řadu dní podroben katalytickému účinku platinové černi. Podle Quastla a Wooldridge není výše potenciálu samotná rozhodující pro možnost řádného pomnožování anaerobů, nýbrž zejména také rychlosť, s jakou redukční procesy probíhají,

a tato je pak pravidelně závislá na účinku fermentů (zejména reduktás) buď těch, které jsou v kultivační půdě (na př. se vyplavují z částeček orgánů do ní přidaných), anebo se uvolňují samotným vzrůstem mikroba. O tom, že redukční potenciál sám nemusí být ve všech případech (t. j. u méně citlivých anaerobů) jedinou nutnou podmínkou vzrůstu, svědčí pokusy Messingovy na bacilu sacharobutyricu, při nichž shledáno, že vzrůst mikroba začal už při hodnotách vyšších, nežli je charakteristické pro anaeroby. Uvádíme z literatury několik měřených hodnot oxyredukčního potencialu u kultivačních půd před naočkováním anaeroba, aby bylo možno srovnati je s hodnotami, které jsme našli my a které budou uvedeny v experimentální části. Uvedená čísla jsou citována podle Freie a Coultera. (Čísla odpovídají hodnotám Eh měřeným v milivoltech a nejsou tedy přepočítána na symbol rH. pH kolem 7—7.4, temperatura není udána a zřejmě se rozumí normální pokojová, t. j. kolem 22° C.) Obyčejný bouillon = + 0.178 volt. Výjimečně také může dosáhnouti hodnot minusových, zejména je-li čerstvě připraven. Játrový bouillon —0.094 až —0.22. Játrový bouillon s kousky jater —0.045, vzácněji až —0.250. Glukosový bouillon —0.048. Bouillon s 3% cysteinu —0.188 až —0.245. Na tomto namátkou vybraném přehledu lze viděti, že jest oxydoregulační potencial kultivačního prostředí tím nižší (vzrůstá v minusových hodnotách), čím je větší jeho schopnost vzrůstová pro anaerobní bakterie. Nejnižší hodnot pak dosahuje tam, kde mohou anaeroby vyrůstat za volného přístupu vzduchu, t. j. v půdách s játry, případně s cystinem. Musíme ovšem upozorniti, že většina údajů, nalezených v literatuře (na př. četné údaje Freiovy), jakož i naše vlastní pozorování mají cenu pouze porovnávací a nemohou být brány

za všeobecně platné fysikálně-chemické konstanty, jako jsou hodnoty udávané Plotzem a Gelssem v jejich exaktní práci; to hlavně proto, že většina z nich, na př. i naše cifry, byly získány měřením při volném přístupu vzduchu. Částečně jsme se tomu snažili odpomoci tím, že jsme většinu měření opakovali ještě po 24 hodinách, aby chom vliv vnikání vzdušného kyslíku mohli správně ohodnotit, částečně tím, že jsme prvé měření provedli ihned po vyrobení půdy, kdy uvedené zevní vlivy byly jistě minimální. Nepovažujeme za vhodné obírat se v rámci této práce technickými podrobnostmi měření oxyredukčního potenciálu. Většinu nutných technických detailů lze nalézti v práci Plotzově, dále v knize Wurmserově a Freiově. Uvádíme jenom tolik, že je možno použít v podstatě dvou metod. Jednak měření potenciometrického, které je daleko přesnější, ale vyžaduje zvláštní techniky a zejména pro určitá měření bakteriologická zvláště adaptované aparatury a dále metody kolorimetrické, kde se vychází ze známého pozorování, že některá barviva se mění redukčními pochody na leukosloučeniny (odbarvují se). Hodnoty kolorimetricky získané jsou ovšem jen přibližné, ale metoda zejména pro bakteriologickou praxi je snáze přístupná. Tak na př. při pH 7·1 a temperatuře 20° C odpovídá dekolorace methylenové modři  $rH = 14$ , Janusové zeleni  $rH = 6$ , kdežto na př. kresylová modř má  $rH =$  přibližně 16.

Bylo již uvedeno, že přítomnost nepatrného kvanta  $O_2$ , nebo peroxydu vodíku v kultivační půdě působí u méně citlivých anaerobů a při masivnějším naočkování dlouhou vzrůstovou latenci (citováno pro bacilla sporogenes), u citlivějších dokonce úplnou jeho inhibici. K zabránění těmto nepříjemným vlivům používáme metod, jež možno dělit zhruba ve 2 skupiny. Prvá skupina nepůsobí

přímo na ovlivnění redukčního potenciálu kultivačního prostředí, neboť odstraňuje pouze atmosférický kyslík, který se nachází nad kultivační půdou, a to buďto způsobem fysikálním (odssátím), nebo chemickým (jako je na př. pohlcení  $O_2$  alkalickým roztokem pyrogalolu). Druhá skupina metod paralyzuje účinek kyslíku přímo v kultivační půdě a mění redukční potencial prostředí na hodnoty příznivé vzrůstu anaerobiontů. Pracuje pak buď způsobem chemickým, t. j. přidáním nejrůznějších redukujících látek k půdě, jinak ovšem pro mikroby nejedovatých, nebo biochemickým (podle Freie). Biochemické metody pak opět využívají buď symbiosy vzrůstové s mikroby aerobními, nebo přidání nejrůznějšího orgánového substrátu, ať už z těl zvířecích, nebo rostlinných. Jelikož oboje metody z druhé skupiny mají veliký praktický význam, který stoupá tím více, že jedině tyto jsou schopny usnadnit techniku anaerobní kultivace takovým způsobem, že ji značně přiblížují běžné technice kultivace aerobní a dále proto, že mnohé z dnes užívaných prostředků jsou v našich poměrech méně známé, vyplíšeme nejdůležitější a nejnovější z nich.

Nejznámější a všeobecně rozšířené je vkládání částeček rozřezaných čerstvých, nebo sterilisovaných zvířecích orgánů do tekutých kultivačních půd, metoda, kterou použil nejdříve Theobald Smith a která u nás bývá pravidelně spojována se jménem Tarozziho. Klasický titul si získala Hiblerem zavedená mozková kaše, přes svoje četné nevýhody. Podobně jako orgány, působí přidání celé krve ke kultivační půdě, nebo použití masové kaše (Lepper a Martin). Nejrůznější modifikace, které není třeba citovati, změnily tvářnost této původní metody. Wrzosek byl první z dlouhé řady dalších, kteří použili k témuž účelu fragmenty tkáně rostlinné, a to buď čerstvého

bramboru, nebo (Douglas, Fleming, Colebroock) kousku mrkve, zelí, části hroznů. Wright užívá dokonce částí vaty. Do jisté míry kuriositou jest použití obilních zrn ve stadiu klíčení (Gori Pio). Velmi praktickou půdou, levnou a snadnou k zhotovení, je půda Mac Clung a Mac Coyova; jest složena z několika % žitné mouky a o něco menšího kvanta sušených jater. Goldie přidává k bouillonu suspensi leukocytů z morčecího peritonea. Podobných účinků jako s leukocyty, dosáhl přidáním filtrátů starých kultur anaerobních mikrobů, ze kterých mohl isolovati látku silně podporující jejich vyrůst, podobnou fermentum, která se dobře adsorbuje na kaolin a rychle se ničí oxydaci. Podle autora je pravděpodobně příbuzná catalase a uvolňuje se rozpadem mikrobů, v jichž těle je obsažena v naprosto minimálním množství. (Tato látka prý způsobuje tak zv. přenosnou aktivaci vyrůstu anaerobních mikrobů). Na tomto místě jsme nutni zdůraznit, že látky produkované vyrůstem mikrobů (zejména anaerobních), které mají vynikající redukční účinek, jsou z největší části neznámy. Každý anaerob, kterému se podaří překonati kyslíkem vyvolanou dobu latence, vyrůstá vlastně dále na basi produktů své vlastní výměny látkové, kterými si stále upravuje redukční potencial půdy až k terminální hodnotě, kterou ve shora citované práci Plotz a Geloso naměřili na  $rH = 5.5$ . Pokud vůbec výme (Quastl, citováno Frei) je mezi nimi cystein, glutathion a kyselina thioglykolová, podobně jako ve zvířecích orgánech. Dále pak určitě slouží za důležité donátory vodíku celá řada aminokyselin, vznikajících rozpadem bakterielních bílkovin a kyselina mléčná z uhlohydrátů. Tyto redukční procesy, spojené hlavně s uvolněním vodíku z uvedených donátorů, mohou ovšem probíhat pouze za součinnosti specifických dehydrás, které jsou

rovněž uvolňovány autolysou starších těl mikrobiálních, nebo jsou bakteriemi jakožto exo-fermenty přímo sekernovány. Weinberg a Guélin dosáhli vynikajících výsledků i u nejtíže kultivovaných anaerobů přidáním sterilního embryonálního extraktu, jaký bývá používán pro výživu tkáňových explantátů. Od těchto prostředků nutno z části oddělit použití symbiotického účinku s mikroby aerobními. Jest to řada metod, o jejichž ceně se již náhodně přesvědčil Pasteur, a které byly k maximu dokonalosti přivedeny Fortnerem. Od předešlých, s nimiž mají celou řadu společného v příznivém účinku (viz Goldie), se liší ještě přímou absorbcí kyslíku, kterou aerobní symbiont využije ke svým oxydacím. Je zajímavou uvědomiti, že nejsme ještě s to podati po všech stránkách uspokojivý výklad příznivého účinku tak zv. biochemických metod. Podle Freie dodávají zejména extrakty ze zvířecích orgánů, ale patrně i některé z rostlinných, do kultivačních půd výživné substance příznivé vývinu i náročnějších anaerobiontů. (Hoder dokázal na př. v četných zeleninách, rajských jablíčkách, banánech, kokosovém mléku akcesorní látku charakteru vitaminů, kterou nazval faktorem Z, podporující vzrůst velmi náročných mikrobů.) Mimo to uvolňují do prostředí látky redukčního účinku, které posunují oxydoreduktivní potenciál půdy na stranu negativní, která je příznivá vzrůstu anaerobiontů. Z těchto látek podle Freie je nejdůležitější glykosa, glycogen, fosfatidy, kyselina jantarová, cystein a glutathion. U posledních dvou nastává spontanní odštěp vodíku za katalytického účinku železa a mědi, rovněž v nepatrných stopách vyplavených z orgánů, u ostatních dochází k témuž pochodu pod vlivem specifických dehydras, uvolněných buď taktéž z orgánů, nebo z močkovaných bakterií. Uvolněný vodík je pak vázán prav-

děpodobně kyslíkem prostředí jakožto akceptorem, čímž je snížena doba latence anaerobního vzniku na minimum. Obojí uvedené však nestačí osvětliti plně intenzitu vznikových pochodů u anaerobiontů, které při použití tohoto kultivačního způsobu i za jinak aerobních podmínek bývají neobyčejně intensivní; jsme tedy nakloněni akceptovati ještě jako další složku výklad Klodnizkyho, který vycházeje z pozorování iniciální vznikové fáze anaerobů v koloidální vrstvě kolem kousků orgánů, pokládá za jednu z vysoce účinných složek vznikových veliké povrchové napětí v intermicelární tekutině, nacházející se mezi částečkami koloidu.

Mnohem jednodušší, alespoň v některých případech, je vysvětlení účinku známých redukčních látek, pro mikrobů přirozeně nejedovatých, přidaných přímo do kultivačního prostředí. Význam anaerobní kultivace za těchto podmínek jest zejména mimořádný a stále stoupá ze dvou důvodů: jednak jest touto skupinou metod zjednodušena anaerobní technika na maximum (možnost kultivace anaerobů za aerobních podmínek), jednak se tímto způsobem stále zvyšuje možnost vniknutí do dosud temných záhad metabolismu anaerobních mikrobů. Zejména to bude možné tehdy, pokud se sestrojí syntetickou půdu, na které by bylo možno za přítomnosti těchto redukčních látek kultivovati anaeroby i značně citlivé. Od tohoto ideálu jsme zatím ještě velmi vzdáleni (na rozdíl od většiny mikrobů aerobních), neboť nejjednodušší půdou, na které se podařilo pěstovati poměrně málo náročného anaeroba, t. j. bacila sporogenes, jest kyselý hydrolysát gelatiny, ke kterému jsou přidány stopy kyseliny thiooctové, tryptofanu, cysteinu a vitaminům podobné látky (Knight a Fildes, Stickland). Z redukčních látek chemicky jednoduchých, užívaných k podpoře

anaerobního vzrůstu, je nejklasičtější glykosa. Pro tyto účely doporučujeme (na základě svých velmi četných zkušeností) užívat nejčistší chemické preparáty, neboť jsme zhusta shledali, že na př. některé z domácích produktů (nepodařilo se nám vyzkoumati, co je toho příčinou) i když dávají fermentaci diagnosticky zcela spolehlivou, na př. pro mikroby ze skupiny tyfus-coli, při anaerobní technice kultivační vzrůst zcela zřetelně inhibují, místo aby jej podporovaly. K dosažení anaerobního vzrůstu se přidává ke kultivační půdě v množství 1—2%. Je nevhodná pro mikroby příliš sacharolytické, neboť okyseluje nadmíru kultivační prostředí, což často vede k zmenšení sporulace, k rychlejšímu rozpadu mikroba a k zeslabení produkce toxinu. Starým a dnes již neužívaným prostředkem jest mravenčan sodný. Jedním z nejúčinnějších pro snížení redukčního potencialu na negativní stranu jest natriumsulfit, zavedený Manteufelem, jehož se přidává přibližně  $\frac{1}{2}$  ccm  $\frac{1}{2}\%$  roztoku na 10 ccm kultivační půdy. Zdá se však, že tato látka není citlivým mikrobům zcela lhostejnou a proto se nevžila. Asi v téže době, jako předcházející v Německu, zavědl ve Francii Berthelot k dosažení anaerobního vzrůstu (za aerobních podmínek) přidání sodné soli kyseliny pyrohroznové, v dávce asi 0,25 g k 10 ccm bouillonu. Naše zkušenosti s touto substancí, pro její nepříjemné chemické vlastnosti, jsou celkem nevalné. O něco později zavědl Kovacz za týmž účelem přidání  $\frac{1}{10}$  promille dimethyl-p-phenylen-diaminu k bouillonu. Podle naší zkušenosti působí tato látka sice dobře, ale lze ji velmi těžko do zásoby uchovati, neboť i in substantia se na vzduchu nesmírně rychle oxyduje a rozpadá. Za veliký pokrok možno považovati nález Japonce Hosoya Seigo, který našel jeden z nejúčinnějších a nejphysiologičtějších pro-

středků v cysteinu. Jeho objev upadl v zapomenutí a zcela samostatně byl znovu učiněn Freiem a Riedmüllerem, kteří používali levotočivý cystein chlorhydrát v kvantu asi 3promilovém ke kultuře přibližně všech anaerobů, realisovatelné takto i za podmínek aerobních. Podle našich zkušeností úplně stejných výsledků se dosáhne v množství daleko menším, na př.  $\frac{1}{2}$ promilovém, které má ještě tu výhodu, že není nutná realkalisace půdy, byla-li tato před přidáním cysteinu zastavena na Ph alespoň 7,6. Právě cystein to jest, u něhož se Frei pokusil velmi zajímavým způsobem o výklad účinku. Za katalytického působení nepatrnných stop solí těžkých kovů, zejména železa, které jsou extrahovány z masa do kultivační půdy, oxydují se 2 molekuly cysteingu (který se takto stává donátorem vodíku) na 1 molekulu cystinu, při čemž uvolněný vodík se váže s kyslíkem vzdušným, pohlceným v kultivační půdě, jakožto akceptorem, takže vzniká vedle molekuly cystinu ještě molekula vody. Tímto pohlcením škodlivého kyslíku, přímo uvnitř kultivační půdy, anuluje se doba latence vzrůstu anaerobního mikroba, který se pomnožuje i za podmínek jinak aerobních. Produkci pak vlastních látek redukčního charakteru, jak o tom bylo shora psáno, postupuje vzrůst dále až k limitním hodnotám. Frei a Riedmüller, Quastl a Stephenson zkoušeli, vedeni tímto objevem, ještě celou řadu jiných sulfhydrilových sloučenin, zejména kyselinu thioglykolovou, která jest však méně vhodná, nežli cystein a glutathion, který jest téměř lepší, nežli cystein, zejména při použití v povrchových kulturnách na plotnách. Jeho obecnému rozšíření se však staví v cestu poměrně vysoká cena. Kyselina thiooctová a dithioglykolová jsou přímo vzrůstu nepříznivé. Z ostatních organických látek, které by bylo možno použíti jakožto dárce

vodíku, zkoušel Frei kyselinu glutaminovou, xantin a kyselinu jantarovou, které se však všechny ukázaly býti poměrně málo vhodnými. V novější době zlepšil Plotz daleko účinek glykosy tím, že její roztok před použitím zahříval s decinormálním louhem, při čemž redukční schopnosti tohoto produktu se prý vyrovnanají cysteinu. Málo užívaný jest návrh M. Nicola na použití sirníku vápenného, který se sterilisovaný přidává ve stopách ke kultivační půdě. Z nejúčinnějších látek anorganických jest podle Plotzových údajů chlорid titanitý — zdá se nám však, že jeho rozšíření se staví v cestu stejně překážky, jako glutathionu. Tím jest však už vlastně dán přechod k oné kategorii chemických substancí, jejichž působení je nejenom chemické, mýbrž i fysikálně-chemické, a to asi ve smyslu shora uvedeného výkladu Kladnitzkého o povrchových silách v intermicellární tekutině u koloidů. Sem by patřil návrh D'Antonův, aby se přidávalo ke kultivačním půdám tekutým velmi jemně rozptýlené kovové železo, které, je-li přímo s půdou sterilisováno při temperaturách přes 100° C, dává vhodnou půdu ke kultivaci anaerobiontů. Jako nejlepší preparát se mu osvědčilo ferrum porphyrisatum purum Kahla. Scott a Brandly k témuž účelu užívají obyčejného redukovaného železa. Konečně se osvědčilo prý přidání asi 15 kapek koloidního zlata, nebo mangianu k bouillonu pro umožnění anaerobního života. Poslední v této řadě je použití 1% suspense agaru v bouillonu, kterážto půda na př. i u nás bývala používána k produkci tetanického toxinu (Feierabend).

Tím jsme vyjmenovali přibližně většinu používaných a v praxi se osvědčivých látek, které jsou schopny — nejčastěji jakožto donátory H — změnit redukční potenciál kultivační půdy na hodnotu příznivou anaerobnímu vzrůstu. K našemu podive-

ní jsme nenašli v odborné literatuře ani naší, ani cizojazyčné, pokud nám je v pracích originálních a referátech přístupná, zmínky o tom, že by byl někdo zkusil k tomu účelu použít látku, jejíž silný redukční účinek je přece již velmi dávno znám a to l-ascorbovou kyselinu, nebli tak zv. vitamin C. Myšlence použití této látky pro kultivaci anaerobiontů, stavěla se hlavně asi na překážku velmi záhy učiněná zkušenost, která v naději therapeutického využití byla brzy neoprávněně přečeňována, to jest seznání baktericidního účinku ascorbové kyseliny. Jsouce si vědomi toho, že to, co škodí mikrobům aerobním, může naopak prospívat mikrobům anaerobním (viz vliv cysteinu na bacila Pfeiffrova u Kishino), vykonali jsme celou řadu informativních pokusů, které potvrdily zcela naše očekávání, že totiž ascorbová kyselina za určitých podmínek působila stejně příznivě, ba někdy ještě mnohem lépe, nežli l-cystein.

O ascorbové kyselině jest již od dálka známo, že má vysoce důležitý význam pro energetické pochody v živé buňce. Svým vysokým oxydo-redukčním potenciálem (který byl mimo jiné rovněž zevrubně zkoumán Wurmserem), má úlohu důležitého meziakceptoru v průběhu oxydačních a dehydrogenačních pochodů buněčných. Její význam je tím větší, že její redukční hodnota je z části reversibilní. Podle Wurmsera a Loureiro je kyselina ascorbová v buňkách nejdůležitějším ze všech glucidů a dokonce ve starší práci soudí autoři, že snad právě v ní je nutno hledati příčinu vysoké hladiny oxydoredukčního potencialu, který lze v buňkách měřiti. In vitro se potenciál ascorbové kys. dosti těžko měří pro její velikou nestálost. Mění se totiž ustavíčně za přístupu vzduchu na svou oxydovanou formu, ale tato reakce je z části zvratná. Zpětný průběh této reakce (která probíhá ovšem pouze ve zlomcích původního kvanta ascorbové kyseliny),

stačí prý vysvětliti do značné míry stálost oxydoredukčních pochodů v buňkách. V nejnovější práci pak Wurmser a Kubo dokazují, že v buněčných systémech existují 3 druhy elektroaktivních systémů, jichž potenciály jsou navzájem odlišné. S jistotou byly zjištěny 2 hladiny oxydoredukční, z nichž jedna odpovídá potencialu v buňkách aerobních bytostí zbavených kyslíku, a je tvořena systémem: kyselina mléčná - pyrohroznová - aldehydy - alkohol. Hladina tohoto je  $-0.20$  voltů při Ph 7. Druhý systém odpovídá kyselině ascorbové a cytochromu a má při stejném Ph  $+0.15$  voltů. Mezi oběma pak leží systém intermediární, který se snaží právě autoři prokázati. Jiný význam ascorbové kyseliny může spočívat v tom, že jest prokázaným aktivátorem fermentů a konečně předpokládá Frei, že při posuzování dýchacích substancí bakteriálních (zejména u mikrobů aerobních) a jejich vztahu k pokusům o novodobou klasifikaci bakteriální, bude nutno uvažovati také o úloze kyseliny ascorbové vedle jiných látek, které již prokázány byly, na př. glutathionu.

Je zajímavovo sledovati, jak je posuzován vztah ascorbové kyseliny k většině pathogenních mikrobů (jsou myšleny převážnou většinou mikroby aerobní), případně k jejich produktům, jako jsou toxiny. Především podle Grooten a Bezsonova bychom měli pokládati za jisto, že ascorbová kyselina dosud v tělech mikrobiálních s určitostí dokázána nebyla. Jelikož jiné vitaminy v nich byly nalezeny, usuzují autoři, že látka tak cizí bakteriálním tělům a tak význačně redukční vlastnosti bude mít i určitě účinek baktericidní. Nejvyhledávanějším objektem pro tyto zkoušky stal se bacil difterický, a jeho toxin, jelikož bylo záhy seznáno, jak množství vitaminu C v nadledvinkách při difterické intoxikaci rychle klesá. Polonyi dokazuje, že difterický bacil v roztoku ascorbové kyseliny rychle ztrácí

virulenci a schopnost hemolysovati. Morčata, infikovaná difterií, mohou prý být zachráněna vstřikováním větších kvanit ascorbové kyseliny. Cardoso prokázal opačný pochod, že totiž difterický toxin rychle rozrušuje vitamin C, nacházející se v nadledvinkách. Hard je podobného názoru jako Polonyi, domnívá se, že prokázal neutralisaci difterického toxinu ascorbovou kyselinou *in vivo* i *in vitro*, při čemž zvířata intoxikovaná di toxinem, mohla podle něho být zachráněna i perorálním podáním ascorbové kyseliny. O něco menším idealistou, ale zato exaktnějším pracovníkem ukázali se být Jungenblut, Claus a spolupracovníci, kteří zjistili, že difterický toxin v dávce 2 MLD jest neutralisován asi 1 miligramem vitaminu C při pokojové temperatuře a mírně kyslé reakci ( $\text{Ph} = 6\cdot6$  až  $6\cdot8$ ), za  $1/2$  hodiny. Byl-li difterický toxin a vitamin C vstřikován zvíratům odděleně, není jeho ničivý účinek příliš jistý. Jestliže však bylo morče delší dobu preparováno ascorbovou kyselinou a poté dostalo intrakutánně  $1/50$  až  $1/500$  MLD difterického toxinu, byla obvyklá zánětlivá reakce zcela negativní. Za celkem nekritickou jest možno považovati práci Gágyiho, který zkoušel účinek ascorbové kyseliny ve  $2\%$  solovém roztoku (rozpuštěnou v normálním fys. roztoku) při  $\text{Ph} 3\cdot5$ ! Za těchto podmínek, které se ostatně v přírodě vůbec nikde nevyskytují, ztrácejí bakterie nejprve virulenci, pak schopnost produkovati toxin a konečně zacházejí, a to již za několik hodin. Bakterie nevirulentní prý ascorbovou kyselinu nedbourávají a nejsou poškozovány, virulentní pak odbourávají a jsou poškozovány, jak právě popsáno. Za jednu z nejexaktnějších jest možno považovati shora citovanou práci Grooten a Bessonova, kteří resumují výsledky své práce asi takto:

1. *In vivo* jest protekční účinek ascorbové kyseliny proti difterickému toxinu i při jedné, maximál-

ně dvou MLD velmi nepatrný a spíše jen prodlouží život zvířat.

2. 4 MLD toxinu in vitro při zhruba neutrální reakci jsou neutralisovány teprve ohromným nadbytkem, t. j. 100 miligramy ascorbové kyseliny.

3. Jinde popsaný baktericidní účinek není účinkem specificky baktericidním, nýbrž výsledkem kyselosti ascorbové kyseliny.

4.  $\frac{1}{2}\%$  ascorbové kyseliny v bouillonu za reakce neutrální nepůsobí celkem nijak na vzrůst většiny mikrobů aerobních i některých anaerobních (?) s výjimkou bacila Bordetova, kterému jest zabráněno v pomnožování a 1% je dokonce usmracen. Tato elektivní bakteriostasa není prý však způsobena jejími redukčními schopnostmi, nýbrž její cyklickou strukturou. Výsledky této experimentální práce jsou ostatně do značné míry podporovány i názorem kliniků (Stepp, Kühnau, Schroeder), kteří potvrzují ve své monografii, že příznivý vliv vitaminu C při difterii jest daleko spíše výslednicí úhrady celkového úbytku ascorbové kyseliny při této chorobě, nežli jejího specifického působení na difterický toxin. Abychom uzavřeli tuto kapitolu, zmiňujeme se ještě o Jungenblutově práci, v níž zkoumá vliv ascorbové kyseliny na poliomyelitický virus. Kvantum kolísající mezi 5 až 10 miligramy ascorbové kyseliny při Ph 6·7, se smrtelnou dávkou 10% suspense mích, která byla v kontaktu při 37° po dobu 1 $\frac{1}{2}$  hodiny a na to přes noc v ledničce, inaktivovalo virus jakéhokoliv původu s určitostí. Je zajímavý porovnat s tímto nálezy Longovy, Perrina a Olitzkého, kterým se osvědčil naopak cystein ve zředění 1 na 2000 za anaerobních podmínek v bouillonu, jako konzervační prostředek zředěného vakcinálního viru.

Vlastní pokusy s ascorbovou kyselinou byly vykonány většinou s preparátem, který nám byl dán s nevšední ochotou k disposici firmou Hofmann a

La Roche ve formě krystalického prášku dobře rozpustného, označeného jako L ascorbová kyselina. Některé terminální pokusy byly vykonávány s preparátem »Cebion« firmy Merck. Pro naše použití nebylo mezi oběma žádného rozdílu. Pokusy jsme rozdělili do několika kategorií:

1. Účinek ascorbové kyseliny na vznik anaerobiontů v tekutých půdách (v obyčejném ústavním bouillonu, nebo ve zvláště připraveném bouillonu telecím) a to částečně za podmínek anaerobních po převrstvení vaselinovou zátkou, hlavně však za plného přístupu vzduchu.

2. Vznik anaerobiontů po přidání ascorbové kyseliny do půd tuhých a to malitých ve formě (ve Francii užívaného) Veillonova agaru. Zde studovaný kolonie uvnitř půdy.

3. Vliv ascorbové kyseliny na vznik anaerobiontů v povrchových koloniích při celkovém zařízení analogickém methodě Fortnerově, při čemž však jako základní substrát použit obyčejný ogar a nikoliv, jako u Fortnera, agar krevní.

4. Vliv přidání kyseliny ascorbové k Fortnerově plotně.

5. Produkce toxinů anaerobních mikrobů v prostředí s kyselinou ascorbovou.

6. Stanovení oxydoredukčního potenciálu půd s ascorbovou kyselinou i půd kontrolních a měření téhož během mikrobielního vzniku.

Použité kmeny mikrobielní pocházejí vesměs z kolekce bakteriologicko-serologického ústavu Karlovy univerzity v Praze, a jsou jednak získány z materiálu domácího, jednak pocházejí z laboratoří pařížských, berlínských, kodaňských a varšavských. Celkem pracováno asi s 35 kmeny striktně anaerobních mikrobů, a to: se 4 různými kmeny bacila perfringens, se 4 různými kmeny vibrio septique, se 3 kmeny bacila oedematiens, s 1 kmenem bacillus gigas, s 1 kmenem bacila haemolytica, se

3 kmeny bacila histolytika, se 4 kmeny bacila sporogenes, s 1 kmenem bacila aerofoetida, se 2 kmeny bacila tetanu, se 4 kmeny Clostridium botulinum a parabotulinum, se 3 kmeny bacila putrifica, s 1 kmenem bacila sacharobutyrica, s 1 kmenem bacila bifermentans, se 2 kmeny bacila tetanomorfa a s 1 nesporulujícím anaerobiontem, to jest bacilem Schmorlovým.

Více než polovina těchto kmenů jest provenience domácí. Všechny pokusy mnohokrát opakovány a kontrolovány za nejrůznějších podmínek. Přesný popis všech experimentů by daleko převýšil možný rozsah této práce, takže se omezujeme pouze na celkový souhrn pokusů. Nikde jsme se neomezili na pozorování vzrůstu pouze pod vlivem ascorbové kyseliny, nýbrž vždy jsme užívali 3 kontrol, současně naočkovaných, pokud je to vůbec možno přesně stejným počtem mikrobů a za stejných podmínek. Kontrolami byly:

1. Půdy bez přidání jakékoli redukční látky.
2. Půdy s glykosou.
3. Půdy s levotočivým cysteinem.

Pokusy v půdách tekutých. Po četných počátečních pokusech jsme se ustanovili na následujícím postupu:

Čerstvě regenerovaný obyčejný bouillon (v kontrolní řadě pokusů telecí bouillon) byl nalit do pokud možno stejných sterilních zkumavek v kvantu přibližně 10 ccm, t. j. tak, aby dosahoval asi do dvoučetinové výše zkumavky. Při tom přihlíženo spíše k tomu, aby výška sloupce kapaliny ve všech zkumavkách byla naprosto stejná, nežli, aby bylo všude přesně stejné kvantum tekutiny. Prvá řada bouillonů zůstala bez jakékoli přísady. V druhé řadě bouillonů přidána glukosa v kvantu 1%. Ke třetí řadě bouilonu přidáno  $\frac{1}{2}\%$  (promile) cysteinu a ke čtvrté  $\frac{1}{2}\%$  (promile) ascorbové kyseliny. Ve všech zkumavkách bylo upra-

vena přibližně mezi 7,2—7,4, což znamená, že u cysteinu a ascorbové kys. byla nutná lehká realkalisace. Ascorbovou kyselinu a cystein nelze v roztočích sterilisovati varem, proto jsme je rozpouštěli koncentrované v destilované vodě, roztok sterilisovali filtrací svíčkou a filtrát přidávali k bouillonu v potřebném kvantu. Jsme si vědomi, že filtračním pochodem pravděpodobně nastává určitá ztráta zkoušených látek, ale pro průběh pokusů se to ukázalo býti bezvýznamné. Velmi těžkým technickým bodem bylo zejména zastavení všech půd na stejném pH. Naočkování dělo se 2 velmi slabými kapkami 48hodinových kultur v játrovém bouillonu. Odečítáno po prvé za 12—15 hodin, dále za 24 hodin a pak postupně až do 6 dnů, kdy pokus byl ukončen. Bouillony v nejdůležitějších seriích pokusů inkubovány zcela otevřené (opatřené pouze lehkou vatovou zátkou), tedy za podmínek aerobních. Konečný effekt kontrolován mikroskopicky, v případě pochybnosti přeočkováním na Fortnerovy plotny. Nečekaně zajímavé výsledky, které vypadají následovně, obdrženy již po 15 hodinách:

V obyčejném bouillonu žádný vzrůst. U glykosy rostou 3 ze 4 použitých kmenů bacila perfringens, sotva znatelný zákal u bacila histolytica (kmen »Berlín«) a u bacila botulina B (»Weinberg«). U bacila perfringense silný vývoj plynu. U cysteinu vyrůstala většina anaerobních mikrobů, z nichž některé ovšem jeví zákal sotva znatelný, s výjimkou 2 kmenů bacila oedematiense, bacila gigase, bacila haemolytica, bacila putrifica (kmen »Fingerland«), bacila botulina (»Berlín«) a bacila Schmorlova. U ascorbové kyseliny vyrůstá i jeden z kmenů bacila oedematiens, velmi slabý vzrůst dokonce i u bacila gigas, nevyrůstá stejně jako u cystelnu botulinus (»Berlín«), putrificus (»Fingerland«) a tetanomorfus. V průběhu dalších kultivačních hodin dorůstají rychle ostatní kultury v cysteinu a v ascor-

bové kyselině, doplnilo se několik dalších kultur v glykose a téměř beze změny zůstává, jak se ostatně dalo čekati, obyčejný bouillon. Po 6denní kultivaci pokus skončen za tohoto stavu (při celkovém použití 32 různých anaerobních kmenů): V obyčejném bouillonu vyrůstá slabě, a to v nečisté kultuře 1 kmen bacila perfringense (kmen »Jung«), sotva viditelně 1 kmen bacila tetanu (netoxický), dále sotva viditelně 2 kmeny bacila histolytica a 2 kmeny bacila botulina), tyto se ukázaly i v jiných pokusech poměrně málo náročné na anaerobiosu). Celkový výsledek je tedy: z 32 kmenů roste 6. a to jen sotva postřehnutelně a ještě částečně se sekundární infekcí. V bouillonech s glykosou vyrůstají všechny kmeny bacila perfringense, netoxický kmen bacila tetanu jako v předešlém pokuse, 2 kmeny bacila botulina, identické s kmeny v předchozím pokuse, částečně 1 kmen bacila histolytika jako v předchozím, bacillus putrificus W a bacil Schmorlův. Vyrůstá tedy celkem z 32 anaerobů pouze 9 a z toho některé slabě. U cysteinu zůstal trvale negativní bacillus tetanomorphus, 1 kmen bacila sporogenes, 2 kmeny bacila oedematiens, bacillus putrifikus W a slabý vzrůst u bacila Schmorlova a bacila haemolytica. Vynechává tedy ze 32 kmenů úplně 5 a 2 rostou velmi slabě. U ascorbové kyseliny úplně vynechává pouze bacillus tetanomorphus a slabě roste bacillus gigas (ještě částečně se sekundárním znečištěním). Bacillus haemolyticus a kmeny bacila oedematiens, které spolu s bacilem gigasem a některými kmeny botulina patří podle našich zkušeností mezi nejnáročnější anaerobionty, rostou zde velmi dobře. Nevyrůstá tedy u ascorbové kyseliny z 32 kmenů anaerobních mikrobů za uvedených podmínek pouze jeden a jeden roste slaběji. Dle těchto experimentů máme tedy právo uzavírat, že ascorbová kyselina při reakci zhruba neutrální, za podmínek námí uvedených, dovoluje vyrůst

strikt ních anaerobů i za podmínek aerobních a že jest v tomto ohledu dokonce zřetelně účinnější a spolehlivější, nežli cystein.

Další řada pokusů, pro nás podřadnějšího významu, byla vykonána s týmiž mikroby v bouillonech za stejných podmínek, ale uzavřených nad to ještě vaselinovou zátkou. Zde byl ovšem rozdíl mezi glykosou na jedné straně a cysteinem na druhé straně méně patrný a projevoval se hlavně u citlivějších mikrobů. Tak na př. u zalepené ascorbové kyseliny vyrůstávají po 15 hodinách všechny kmeny bacilla oedematiense, lehce vyrůstá bacillus haemolyticus, citlivější botulinus, putrificus Fingerland, tetanomorfus, tedy mikroby, které pod vlivem kyseliny ascorbové za podmínek aerobních po 15 hodinách ještě nerostly. U glykosy po téže době žádný z těchto citlivých anaerobů nevyrůstal, ale dorostly vesměs do tří dalších kultivačních dnů, takže po 6denním porušení pokusů není valného rozdílu mezi glykosou, cystinem a kyselinou ascorbovou, zůstává však velký rozdíl mezi těmito a bouillonem bez redukčních látek, kde vznik citlivých anaerobiontů zůstal až do konce negativní. Tvorba plynu u značně plynnotvorných bakterií (*bacillus perfringens*, *vibrio septique*, *sporogenes*, *putrificus*), znatelná podle vysunutí vaselinové zátky, je značně větší u glykosy, nežli u obou zkoušených redukčních látek. Ale i terminální Ph, což jistě není mikrobu na prospěch, je daleko více posunuto na kyselou stranu u glykosy nežli u kyseliny ascorbové. Orientačně bylo zkoušeno vstříknutí některých pathogenních anaerobiontů jako *bacillus oedematiens*, *vibrio septique*, *bacillus gigas* a *bacillus histolyticus*, vypěstovaných jednak ve standardních játrových bouillonech s vaselinovou zátkou (jak jsou běžně užívány v bakteriologicko-serologickém ústavu Karlovy univ.), jednak u těch, vypěstovaných z bouillonů s ascorbovou kyselinou za přístupu

vzduchu. Použito bylo takových dávek, které jsou nám ze zkušenosti známy jako právě postačující k usmrcení experimentálního zvířete. V celku musíme potvrditi, že nelze pozorovati žádný nápadný rozdíl v pathogenitě mezi mikroby, vypěstovanými za obyčejných podmínek a oněmi z ascorbové kyseliny. K této řadě pokusů v tekutých půdách byly připojeny 2 kmeny bacila difterického vesměs toxicke a 1 kmen bacila anthraxu. Uvedené aeroby očkovány do všech 4 druhů půd, nalitych ve stejně vysoké vrstvě, jako u anaerobů a z stejného Ph. Anthrax vyrůstal ve všech 4 půdách přibližně stejně rychle, mohutně a naprosto charakteristicky. Po dokončení kultivace porovnáván bacil, vypěstovaný v obyčejném bouillonu, s bacilem vyrostlým v kyselině ascorbové (obě kultury 6 dní staré) na virulenci. Stejně těžká morčata, infikovaná přibližně  $1/100$  každé z bouillonových kultur, zašla za stejnou dobu. Rovněž v obraze morfologickém a v rychlosti sporulace nemohli jsme prokázati podstatných rozdílů. Oba použité kmeny bacila difterického rostly atypicky pouze v glykose, kde tvorily difusní mohutný zákal, bez pelikuly. V půdách s cysteinem a s ascorbovou kyselinou rostly charakteristicky, s lesklým iniciálním zákalem, později zrnitým sedimentem a zejména u cysteinu a u ascorbové kyseliny s povrchovou blankou mnohem hutnější, nežli u obyčejného bouillonu. Ani zde nemohla býti prokázána pro ascorbovou kyselinu zřetelná degenerační stigmata a při orientační zkoušce na toxicitu byla tato snížena pouze pro mikroba pěstovaného v glykose, pro všechny ostatní půdy, pokud je možno z pokusů pouze orientačních souditi, zůstala úplně stejná.

Z celé této kapitoly kultivace v půdách tekutých, mnohokrát opakované, přezkoušené na nejrůznějších kmenech a s nejrůznějšími várkami bouillonu jsme získali zcela nový poznatek, že

$1\frac{1}{2}\%$  ascorbové kyseliny (větší dávku nedoporučujeme, jelikož pak jest nutná příliš značná korekce Ph) umožnuje vznést striktních anaerobů za aerobních podmínek podobně jako cystein, ale ještě dokonaleji, neovlivňuje nijak nepříznivě morfologii, vitalitu a pathogenní vlastnosti anaerobů, a co je dále zajímavé, nepůsobí v tomto kvantu a při tomto Ph nikterak nepříznivě ani na toxiccké, nebo virulentní mikroby aerobní.

II. Vzrůst uvnitř modifikovaných agarů podle očkovacího způsobu Veillonova. Za tímto účelem vyroben 2% agar z telecího bouillonu, který nejčastěji používán sub. I. a ke každému agaru před ztuhnutím a naočkováním přidáno:

1. 1% glykosy sterilisované ve vodním roztoku,
2. přibližně  $1\frac{1}{2}\%$  filtrací sterilisovaného roztoku cysteinu,

3.  $1\frac{1}{2}\%$  stejně připraveného roztoku kyseliny ascorbové. Agaru bez redukčních látek v tomto případě použito nebylo, ježto podle našich zkušeností je vysoce pravděpodobné, že by tam, snad s výjimkou bacila perfringens, žádný jiný anaerob nerostl. Pro každého mikroba bylo naočkováno 5 rourek s agarem (přirozeně ještě tekutým po přidání redukčních substancí), a to »sans récharger« podle známé Veillonovy metody. Prvé odečítání se dalo po 18 hodinách, dále po 24, 48, atd., a pokus ukončen po 6 dnech kultivace. V těchto pokusech byl z uvedených mikrobů použit od každého druhu pouze 1 kmén, a sice ten, který se v jiných pokusech, a to buď v tekutých půdách, nebo v oněch, popsaných sub III. osvědčil jakožto nadaný největší vzrůstovou schopností. Po 18 hodinách vyrůstá v glykoze: perfringens (s koloniemi asi velikosti špendlíkové hlavičky), ve všech naočkovaných půdách, při čemž všechny

agary jsou úplně roztrhány plynem; bacillus oedematiens tvoří sotva viditelné kolonie pouze v první kultivační rource; histolyticus, ve všech rourkách dosti dobrý vzrůst v právě viditelných koloniích; sporogenes, ve všech rourkách vzrůst právě viditelných kolonií; vibrio septique, kolonie až do třetí rourky, velmi nepatrných rozměrů, ale typického vzhledu, agar roztrhán; gigas zcela negativní; haemolyticus, kolonie na hranicích viditelnosti; putrificus, vzrůst ve všech půdách, ale malých, charakteristických kolonií, agar dislokován; tetanomorfus, pouze do druhé půdy, sotva viditelné; botulinus A neroste; bacil Schmorlův neroste; tetanus, vzrůst sotva postřehnutelný; cystein: perfringens přibližně stejný jako u glykosy, ale agar jest daleko méně roztrhán; oedematiens roste až do třetí rourky, tvoří zřetelné kolonie mnohem větší, nežli u glykosy, přičemž sterilní povrchová zona činí pouze třetinu výšky, nežli u glykosy; histolyticus, vzrůst velmi dobrý, sterilní zona stejně zmenšena; sporogenes, kolonie až dvojnásobné velikosti proti oném v glykose, velmi charakteristického vzhledu; vibrio septique, kolonie mnohem větší nežli u glykosy, ale daleko jemnější struktury; gigas, nepatrné kolonie až do druhé rourky, typického vzhledu; haemolyticus, vzrůst drobných, ale typických kolonií až do třetí rourky, zona zredukována; putrificus asi jako u glykosy, ale agar je méně roztrhán; tetanomorfus, až do poslední rourky zřetelné a dobře vyvinuté kolonie; botulinus A až do čtvrté rourky zřetelně vyvinuté kolonie; Schmorl až do čtvrté rourky malé, ale dobře vyvinuté kolonie; tetanus rovněž. Ascorbová kyselina: perfringens a oedematiens jeví stejně dobrý vzrůst jako u cysteinu, redukce sterilní zony jest ještě větší. Histolyticus, podobně jako cystein, ale redukce zony jest zvlášt ná-

padná; sporogenes jako cystein, ale kolonií jest větší počet; vibrio septique, jemné, veliké, nápadně charakteristické kolonie, lépe vyvinuté, nežli u cysteinu; gigas, vznrůst spíše lepší, nežli u cysteinu; haemolyticus stejný, jako cystein; putrificus jako cystein, ale sterilní zona téměř neexistuje; tetonomorfus podobně jako cystein, částečná fragmentace prostředí; botulinus stejný jako cystein; Schmorl stejný jako cystein, ale mnohem více kolonií; tetanus stejný jako cystein. Při ukončení pokusu vypadá stav pro jednotlivé mikroby asi následovně: Glykosový agar: u perfringense, vibrio septique, putrifica, tetanomorfa k nepoužití roztrhán a z trhlin sekundárně znečištěn. Oedematiens, gigas, botulinus, haemolyticus, Schmorl a tetanus vyrůstá celkem chudě. U cysteinu a ascorbové kyseliny vznrůst přibližně stejně intensivní; s výjimkou perfringense a sporogenese, jsou kolonie vesměs větší a charakterističtější vzhledu, nežli u glykosy, agar nepatrнě roztrhán a neznečištěn. Výsledky s kyselinou ascorbovou, zejména u vibrio septique, putrifica a gigase jsou ještě zřetelně lepší, nežli u cysteinu. Zvláštní výhodou půd s cystinem a ascorbovou kyselinou jest poměrně nepatrнě roztříštění agaru plynوتornými mikrobami, zvláštním znamením pak, které svědčí o tom, že redukční potenciál cystinových a vitaminových půd je daleko více snížen na negativní stranu, jest zúžení sterilní povrchové zony přibližně na  $\frac{1}{3}$  toho rozměru, který jsme pozorovali u agarů glykosových při našem experimentálním zařízení. Celkem lze z tohoto pokusu stoprocentně potvrditi výsledky získané s ascorbovou kyselinou v půdách tekutých, totiž, že tato jest daleko lepším zdrojem pro anaerobiosu nutných redukčních pocho-

dů, nežli např. běžně používaná glykosy.

III. Mikroby očkovány na agarové plotny, k dosažení charakteristických, povrchových kolonií. Tyto experimenty byly nejpracnější ze všech, neboť téměř všechny byly mnohokrát opakovány, zejména tam, kde dva různé experimenty u stejného mikrobiálního kmene nedaly výsledky identické. Ke kultivaci bylo použito Fortnerových misek (o poloviční výšce normální Petriho misky) a i jinak zachován celkový postup Fortnerovy kultivace, t. j. použito symbiosy s bacilem prodigiosem a uzavření skleněnou plotnou s plastilinovým zalepením. Proti typické Fortnerově plotně měly tyto půdy tu velkou výhodu, že byly téměř průhledné, takže postup vzrůstu mohl být sledován bez otevření anaerobního systému. Celková inkubační doba činila 4 dny, ačkoliv většinou již od třetího dne kolonie ve vzrůstu nepokračovaly. Materiál byl nanesen na kultivační plochu v jedné drobné kapce 48hodinové kultury anaeroba v játrovém bouillonu, která musela být u všech půd též serie naprostě stejná. Jestliže se to nepodařilo, musel být pokus opakován. Rozočkování z této kapky se dělo celkem ve 4 přerušených čarách, vždy stejně dlouhých, při čemž při každém přerušení byla klička vypálena. Jedině za takto exaktních podmínek bylo možno dosáhnouti přibližně stejně hustého rozočkování kultury, ale i tak se výsledky braly s reservou a hodnotili jsme je jako úspěšnější, nebo jako méně úspěšné jen tehdy, když byl rozdíl velmi značný a když téhož rozdílu bylo v několikrát opakovaných pokusech dosaženo ve většině případů. Jako kultivační substrát byl použit:

1. obyčejný agar z telecího bouillonu,
2. týž agar s 1% glykosy,
3. agar s 1% cysteinu,

#### 4. totéž s 1% ascorbové kyseliny.

Ph všech půd v terminálních pokusech kolísalo mezi 7,2 až 7,4. Ph vyšší nežli 7,5 bylo vhodné pro půdy s glykosou, která po mikrobielní sacharolyse okyseluje, ale nevhodné pro kyselinu ascorbovou, jejíž redukční účinek při vyšším Ph zřejmě rychle klesá. Rozdíly, pozorované u jednotlivých mikrobů při použití těchto půd, jsou přirozeně daleko menší, nežli u půd tekutých za aerobních podmínek a ú kultur uvnitř agaru. Jsou spíše analogické oném v tekutých půdách, uzavřených vaselinou. Je to pochopitelné, neboť symbiosa s prodigiosem sama stačí k realisaci anaerobiosy, nejde-li o mikroby zvláště citlivé a dále ještě i obyčejný agar v těchto případech má dostatek redukčních látek, které jsou výslednicí výměny látkové bacila prodigiosa a od něho zřejmě difundují, v téměř potřebném kvantu, celým agarem. Je docela možno si představiti, že redukční potenciál kultivační půdy sumací účinku kyseliny ascorbové a produktů bacila prodigiosa může být snížen až na hodnoty nepříznivé, udané Plotzem ( $rH = -2$ ). Kyselina ascorbová a podobně i cystein v těchto pokusech nebyly filtrovány, neboť jsme pozorovali, že koncentrovaný roztok ascorbové kyseliny a stejně tak i cysteinu, byl-li ponechán na chladném a temném místě asi  $\frac{1}{2}$  hodiny, je v důsledku své kyslosti a redukčních vlastností prakticky úplně sterilní. Ovšem konečná kvanta ascorbové kyseliny, přidaná do kultivační půdy, jsou menší, než jak je udáno, ale prakticky to zůstalo bezvýznamným. Celou řadu zajímavých podrobností, zejména týkajících se rychlosti vzrůstu, tvaru a průhlednosti kolonií, masivnosti, nebo jemnosti povlaků, tvaru charakteristických výběžků z povlaků vysílaných a konečně zápachu, jsme nutně vynechat, ačkoliv některé z nich by zasloužily, aby se staly předmětem zvláštní

práce. *Bacillus perfringens*: nejrychlejší vzrůst a největší kolonie na kyselině ascorbové, na druhém místě by stála glykosa, k našemu podivení ještě za ní by byl cystein a na čtvrtém místě agar bez redukčních substancí. (Pro tento pokus použity celkem 4 kmény.) *Bacillus oedematiens* (3 kmény): na prvním místě ascorbová kyselina s charakteristickými koloniemi podle Zeisslera, téměř stejně dobrá je glykosa, o něco slabší je cystein a na posledním místě agar beze všeho. *Bacillus gigas*: nejlépe vyvinuté a nejvíce kolonií s ascorbovou kyselinou, cystein, glukosa a agar beze všeho, dávají asi stejný vzrůst, o něco slabší, nežli u předešlého. *Vibrio septique* (3 kmény): nejlepší kyselina ascorbová (u všech kménů), na druhém místě cystein, na třetím glykosa a na agaru beze všeho pouze zcela ojedinělé, naprostě necharakteristické kolonie. Proti vzrůstu na Fortnerově plotně je však i má ascorbové kyselině a cysteinu spíše tendence k tvorbě uzavřených kolonií s četnými výběžky, nežli tvoření homogenních povlaků. *Bacillus haemolyticus*: má podobný pořad vzrůstu jako *bacillus gigas*. *Bacillus sporogenes* (4 kmény): u dvou kménů není valného rozdílu mezi vzrůstem na jednotlivých redukčních látkách, pouze u 2 kménů (»Teta a Weinberg«) je cystein a ascorbová kyselina lepší, nežli glykosa. Zvláště dobrou látkou pro bacila sporogenes se zdá být výjimečně cystein. Kultury bacila sporogenes na cysteinu zvláště penetrantně zapáchají sirovodíkem. U bacila *histolytica* (tři kmény): kmen »Pasáž« má nejlepší vzrůst na půdách s cystinem, u kmene »Berlín« je nejlepší ascorbová kyselina. U třetího není valného rozdílu mezi jednotlivými látkami. *Bacillus botulinus* (4 kmény) »A, B, C, D« a 1 kmen bacila *parabotulina*: ve čtyřech případech nejlepší vzrůst na ascorbové kyselině a cysteinu, v jednom případě

pouze na ascorbové, při čemž cystein se rovná asi glykose. *Bacillus tetanus* (2 kmeny): málo toxický kmen tetanu »Stráň« má nejlepší vznět na ascorbové kyselině. U kmene »Varšava« je nejlepší vznět na cysteinu, při čemž ascorbová kyselina a glykosa jsou přibližně stejné. Ze saprofytických mikrobů zkoušeny 2 kmeny bacila putrificia, 1 kmen bacila bifermentans a 1 kmen bacila aerofoetida. *Putrificus »Fingerland«*: nejlepší vznět na cysteinu, pak na ascorbové kyselině; na glykose a na obyčejném agaru vznět velmi slabý. *Bacillus putrificus »W«*: kyselina ascorbová nejlepší, cystein a glykosa asi stejné. *Bacillus bifermentans »Praha«*: vznět na všech půdách přibližně stejný, při čemž kolonie na glykose jsou nejmasivnější, ale mají nejmenší tendenci k tvorbě povláček. Tento mikrob jest jeden z oněch mála anaerobů, jehož kolonie na půdách s redukčními látkami, ale bez bílkovin dosahují daleko větších rozměrů, nežli na typické Fortnerově plotně. *Bacillus aerofoetidus*: nejlepší vznět na ascorbové kyselině, mnohem slabší v glykose a cysteinu. Z ostatních mikrobů zkoušen ještě *bacillus sacharobutyricus* a *tetanomorfus*. Je vysoko zajímavé, že oba tyto mikroby v povrchových koloniích jsou favorisovány ve vznětu pouze glykosou, zejména ovšem *bacillus sacharobutyricus*. Na půdách se silně redukčními látkami je vznět zřetelně horší. u *sacharobutyrica* téměř žádný. Bacil Schmorlův v tomto pokuse užit nebyl.

IV. Ve čtvrté řadě pokusů přidávána kyselina ascorbová v kvantu 1% k typické Fortnerově plotně s 10% králičí krve. Kontrolou byla obyčejná Fortnerova plotna bez přidání jakýchkoliv jiných redukčních látek. Ph kultivačních půd i očkovací technika byly přibližně stejné, jako v předcházejících pokusech. Od každého druhu mikrobiálního byl použit pouze 1 kmen podle výběru, jako sub-

II. Vzrůst sledován po dobu 48 hodin. *Bacillus perfringens*: kolonie přibližně stejné velikosti, haemolysa daleko zřetelnější a ve větším rozsahu u ascorbové kyseliny. *Vibrio septique*: daleko rychlejší vzrůst (kontrolovaný několikerým otevřením plotny během prvních 24 kultivačních hodin) na kyselině ascorbové. *Bacillus histolyticus*: kolonie po 48 hodinách větší a mukosnější. *Bacillus sporogenes*: zřetelně lepší na ascorbové kyselině, ale až po celých 48 hodinách. *Bacillus oedematiens*: zřetelně lepší na ascorbové kyselině. *Bacillus gigas*: mnohem masivnější vzrůst na ascorbové kyselině. *Bacillus haemolyticus*: na obyčejné Fortnerově plotně výjimečně lepší. *Bacillus tetani*: na ascorbové kyselině již během prvních 24 hodin asi třikrát rychlejší vzrůst na ascorbové kyselině. *Bacillus putrificus* a *tetanomorphus* stejně, jako *bacillus tetanu*. *Bacillus botulinus*: na Fortnerově plotně více rozrostlý, ale na ascorbové kyselině roste masivněji. *Bacil Schmorlův*: výjimečně vzrůst zřetelně slabší na ascorbové kyselině. Je tedy viděti i z experimentů sub III. a IV., že ascorbová kyselina podobně jako cystein, přidána k pevným kultivačním půdám, zlepšuje, za jinak běžných anaerobních zařízení, možnosti vzrůstu anaerobiontů v povrchových koloniích. V četných případech se ukázala dokonce lepší, nežli cystein, takže při nejmenším může být považována za rovnocennou s Freiem zkoušeným glutathionem. Je jen málo případů, kde by byl cystein výhodnější a jen docela ojedinělé (*sacharobutyricus*, *tetanomorphus*), kde glykosa předčila obě látky předcházející. Co však je zvláště zajímavým poznatkem z těchto pokusů (potvrzuje naše již dřívější pozorování) a co považujeme za novum, které je nutno v zájmu diagnostiky anaerobů zvláště zdůraznit, je pozorování, že tvar povrchových anerobních kolonií,

který je Zeislerem považován za znak druhově stálý (byť i v určitých mezičích kolísající), je z velké části funkcií oxydoredukčního potenciálu kultivační půdy (částečně jistě také vlhkosti a Ph kultivační půdy, což je ostatně samozřejmé). Neplatí to snad ve stejné míře pro všechny druhy anaerobů, ale určitě pro ty, které vyrůstají v koloniích opatřených výběžky, nebo které mají tendenci k tvorbě povlaků. Tento zjev, který je schopen vysvětliti četné z dosavadních růzností v popisech anaerobních kultur, pokládáme za tak důležitý, že se k němu vrátíme ve speciální práci. Pokud se týče bodu sub IV. zvláště, připomíná nám četné výtky, které byly činěny (jen zčasti právem) původní Fortnerově metodě a jež se týkají její, prý malé citlivosti. Naše zkušenosti je mohou potvrditi jen v malém počtu případů; tam však, kde by byla Fortnerova plotna skutečně nedostatečná, je možno ji modifikovati přidáním 1% ascorbové kyseliny, čímž vznikne kombinace vyhovující zcela určitě i daleko nejcitlivějším anaerobům, při prvém pokusu o isolaci přímo z materiálu — což bývá nejtěžším úkolem.

V této řadě na naše poměry obtížných experimentů jsme se snažili jen zcela orientačním způsobem nabýti informací o tom, jak působí ascorbová kyselina na produkci toxinů nejrůznějších anaerobních mikrobů, zda je v tomto smyslu látka indiferentní, nebo zda by mohla případně s úspěchem nahraditi glykosu, které se dosud té měř ve všech případech k produkci anaerobních toxinů používá. Zdůrazňujeme, že naše výsledky mají cenu pouze orientační, neboť naše zařízení a nutnost šetřiti se zvíraty nám nedovolilo opakovati tolikrát veškeré pokusy, kolikrát by to bylo

žádoucí. Neměli jsme času adaptovati svoje kmeny za optimálních podmínek a učiniti dostatečný počet subkultur, jak je to při produkci toxinů k technické potřebě nutné. Nemohou tedy býti naše výsledky vůbec srovnávány na př. s obdobnými, získanými v našem St. Z. Ú., mají cenu pouze pro porovnání samy mezi sebou. K produkci toxinu užity zvláště veliké zkumavky, které jsme si specielně k tomu účelu dali zhотовiti, které snadno pojaly 150—200 ccm bouillonu ve velmi vysoké vrstvě. Pracováno pod uzávěrem z nujolu, nebo sterilní vaseliny. Složení půd je naše původní a vypadá asi následovně: K produkcii toxinu vibrio septique, bacila histolytica a bacila tetanu, byl užit bouillon skládající se ze dvou třetin z obyčejného telecího bouillonu a z jedné třetiny z bouillonu vyrobeného peptickým natrávením krevního koláče. Bouillony, čerstvě regenerované, nality v množství 150 ccm do popsaných zkumavek, načež k jednomu přidáno 1% glykosy, k druhému  $\frac{1}{2}\%$  ascorbové kyseliny. U tetanu specielně připojen ještě třetí bouillon, k němuž přidáno i 1% glykosy i  $\frac{1}{2}\%$  ascorbové kyseliny a jako kontrola přidán bouillon čtvrtý, který rovněž obsahuje glykosu a kterého se běžně užívá v našem St. Z. Ú. k produkci tetanického toxinu. Jeho potřebné kvantum nám bylo přenecháno laskavostí oddělení pana doc. dra Vaníčka. Konečné pH všech bouillonů rovnalo se 7·2. Pro produkci toxinu bacila botulina byl námi sestrojen speciální bouillon, skládající se z jedné třetiny z telecího bouillonu, z jedné třetiny z bouillonu z natrávených krevních koláčů a z jedné třetiny z koncentrované Bramborové šťávy. Dále rovněž přidána glykosa v dávce asi  $\frac{3}{4}\%$  a k jiné dávce ascorbová kyselina opět v kvantu  $\frac{1}{2}\%$ . Ph adjustováno na 7·3. Pro nedostatek času mohl býti tetanickej a botulinický bouillon inkubován pouze po dobu necelých 10, případně 12 dnů, takže konečného mož-

ného titru určitě dosaženo nebylo. Toxin bacila histolytica a vibrio septique inkubován, jak zvykem, krátkodobě. Titrace u tetanu a botulinu byla provedena na morčatech; u bacila histolytica zkoušen titr intrakutánní aplikací toxinu, při čemž jako MCD jsme označili v našem případě nejmenší množství toxinu, které podáno intrakutánně v celkovém množství asi 1/10 ccm vyvolá do tří dnů nekrosu asi 4 mm v průměru. Toxin vibria septique titrován na myškách intravenosním vstřikováním v dávce  $\frac{1}{2}$  ccm. Celkové výsledky byly pro nás jistým překvapením, neboť je z nich patrno, že ve všech případech je produkce toxinů o něco lepší v bouillonech s glykosou, nežli s ascorbovou kyselinou. Tak na př. nejmarkantnější rozdíl byl u toxinu bacila histolytica, kde toxin s glykosou vyvolával zřetelnou nekrosu ještě do zředění 1 na 10, kdežto toxin za použití ascorbové kyseliny pouze ve stavu koncentrovaném. Náš titr pro toxin bacila histolytica vyrobený v glykosovém bouillonu, stanoven asi 100 MCD v 1 ccm, kdežto onen produkováný v bouillonu s ascorbovou kyselinou, má titr desetkrát menší. Pro vibrio septique stanoven titr glykosového toxinu asi na 15 MLD v 1 ccm, pro kyselinu ascorbovou pouze na 10. Titr toxinu botulinického u obou půd dosáhl stejné hodnoty, a to asi 1000 MLD v 1 ccm. Je to ovšem titr proti údajům v literatuře nesmírně nízký, ale jak již řečeno, šlo nám pouze o porovnání. Nejjazijavější výsledky zjištěny pro tetanus. (Přirozeně použito ve všech případech téhož kmene bacila tetanu, příprava půd a inkubace i titrace u všech konána současně.) Toxin v našem bouillonu s glykosou měl titr přibližně asi 5000 MLD v 1 ccm, kdežto s ascorbovou kyselinou v témže bouillonu pouze 1000 MLD v 1 ccm. Při použití tetanického bouillonu St. Z. Ú. (který rovněž obsahuje glykosu) jsme dosáhli titru pouze asi 4000 MLD v 1 ccm, kdežto v našem

bouillonu s glykosou i ascorbovou kyselinou dosaženo titru 10.000 MLD v 1 ccm. Jelikož k vůli úspoře místa, bohužel, nemůžeme publikovati všechny podrobné tabulky našich titrací, přikládáme pouze jedinou z nich a to nejzajímavější, která se týká na posledním místě zdůrazněného výsledku.

### Tetanus 3.

Tetanický bouil. St. Z. Ú. Telecí bouil. s glyk. i s asc (s glykosou).

zředění	číslo morčete	výsledek	zředění	číslo morčete	výsledek
1:5000	93	† 4.20	1: 1000	174	† 1.—
1:10000	911	++++	1: 5000	996	† 2.20
1:15000	408	+++	1:10000	183	† 3.20
<b>Titr stanoven asi na 4000 MLD v 1 ccm.</b>			1:15000	447	++++
			1:20000	395	† 7.20

**Titr stanoven na 10.000  
MLD v 1 ccm.**

† značí smrt zvířete s označením doby; cifra před tečkou = počet dní, za tečkou = počet hodin.

+++ značí celkový tetanus velmi silně vyznačený.  
++ značí slabší celkový tetanus.

Konečným výsledkem vypsaných pokusů je konstatování fakta, že v dosavadních pokusech se ascorbová kyselina (jako ostatně i jiné redukční látky) ukázala méně vhodným prostředkem pro produkci anaerobních toxinů, nežli glykosa. Je však docela možno, že její málo příznivý vliv jest pouze zdánlivý, neboť urychluje vzrůst mikrobů anaerobních mnohem nápadněji (2 a 3× rychlejší vzrůst za anaerobních podmínek), jak viděti z experimentů sub. I., II., III., nežli glykosa a je tedy možno, že i maximum produkce toxinu nastává za dobu daleko kratší, nežli u bouillonů glykosových, takže my jsme vlastně zkoušeli toxicitu na sestupné fázi. Bohužel, nedostatek zvířat nám zabránil přesvědčiti se o pravdivosti naší domněnky. Za pozitivní a možno že prakticky významný považujeme výsledek, získaný při současném použití glykosy

i ascorbové kyseliny pro produkci toxinu, neboť dvojnásobné stoupenutí titru toxinu, vyrobeného jinak za úplně stejných podmínek, nelze vyložiti náhodou, nýbrž skutečně významným působením kombinace: glykosa + ascorbová kyselina.

VI. Pro ukončení uvádíme některá měření oxydoredukčního potenciálu půd, kterých jsme užívali v celé naší práci a to jednak před inkubací, jednak během vzrůstu některých mikrobů, jako je bacillus sporogenes, putrificus, atd. Určení se dělo potentiometricky s nasycenou kalomelovou elektrodou za použití elektrody zlaté i platinové. O posuzování výsledků námi získaných jsme již předeslali v části úvodní. Rovněž pro nedostatek místa neuvedlme výsledky všechny, nýbrž pouze nejdůležitější. Měření oxydoredukčního potencialu našeho telecího bouillonu provedené 10. VIII. 1937 při temperatuře 25° C a Ph 7·5:

- |                                   |                      |
|-----------------------------------|----------------------|
| a) bouillon bez redukčních látek  | = +0.020 volt        |
| b) bouillon s glykosou . . . .    | = +0.018 volt        |
| c) bouillon s cysteinem . . . .   | = -0.090 volt        |
| d) s ascorbovou kyselinou . . . . | = <u>-0.095 volt</u> |

Z těchto výsledků lze na první pohled viděti vysoké redukční schopnosti bouillonu s cysteinem a s kyselinou ascorbovou, jejichž hodnoty jsou přibližně stejné. V dalším pokuse jsme měřili týž bouillon, ale o 24 hodin později při téže temperatuře a za podmínek prakticky aerobních.

- |                          |
|--------------------------|
| a) = +0.030 volt         |
| b) = + 0.012 volt        |
| c) = -0.30 volt          |
| d) = <u>-0.056 volt.</u> |

Z tohoto příkladu jest velmi hezky viděti, jak

spolehnouti na svoje čísla, máme dokonce právo usuzovati i podle měření Eh potentiometrickou cestou to, co se nám ukázalo již dříve v experimentu, že totiž ascorbová kyselina jest po stránce redukčních schopností prostředkem ještě dokonalejší, nežli cystein a co je hlavní, a vlastně nečekané, že její redukční schopnosti za přístupu vzduchu déle vytrvají (viz údaje po 24 hodinách), než-li u cysteingu.

Závěrem uvádíme jediné měření z mnohých, provedené na bacilu *sporogenes*, inkubovaném do našich 4 běžných bouillonů:

- a) obyčejný,
- b) s glykosou,
- c) s cysteinem,
- d) s ascorbovou kyselinou.

Před inkubací při pH 7·4 a temperatuře 25° C měly bouillony a) i b) hodnoty plus v milivoltech, c) a d) měly kolem —0·140 voltů. Přidání 2 kapek kultury a tříhodinná inkubace při 37° C stačily k tomu, aby plus hodnoty u a) a b) bouillonu se změnily na —0·033 a —0·025. Hodnoty c) a d) se proti hodnotě nenačekovaného bouillonu téměř nezměnily. Po 25 hodinách inkubace má bouillon a) —0·040, b) —0·045, c) —0·265 a d) —0·200. Při tom v bouillonu a) a b) nejsou žádné makroskopicky viditelné známky vzrůstu, kdežto v bouillonu c) a d) je mikrob velmi dobře vyrostlý a v c) zvláště silně zapáchá (viz v kapitole sub. III. zmínku o zvláštní affinitě bacila *sporogenes* pro cystein). Jak viděti ověřují námi měřené Eh hodnoty i když jsme si vědomi nepřesnosti našeho měření, plně výsledky získané experimenty in vitro o rovnocennosti, ba dokonce jakési převaze ascorbové kyseliny v účinku na vzrůst anaerobů, za aerobních podmínek.

Chemismus tohoto nápadně příznivého účinku

spolehnouti na svoje čísla, máme dokonce právo usuzovati i podle měření Eh potentiometrickou cestou to, co se nám ukázalo již dříve v experimentu, že totiž ascorbová kyselina jest po stránce redukčních schopností prostředkem ještě dokonalejší, nežli cystein a co je hlavní, a vlastně nečekané, že její redukční schopnosti za přístupu vzduchu déle vytrvají (viz údaje po 24 hodinách), než-li u cysteingu.

Závěrem uvádíme jediné měření z mnohých, provedené na bacilu *sporogenes*, inkubovaném do našich 4 běžných bouillonů:

- a) obyčejný,
- b) s glykosou,
- c) s cysteinem,
- d) s ascorbovou kyselinou.

Před inkubací při pH 7·4 a temperatuře 25° C měly bouillony a) i b) hodnoty plus v milivoltech, c) a d) měly kolem —0·140 voltů. Přidání 2 kapek kultury a tříhodinná inkubace při 37° C stačily k tomu, aby plus hodnoty u a) a b) bouillonu se změnily na —0·033 a —0·025. Hodnoty c) a d) se proti hodnotě nenačekovaného bouillonu téměř nezměnily. Po 25 hodinách inkubace má bouillon a) —0·040, b) —0·045, c) —0·265 a d) —0·200. Při tom v bouillonu a) a b) nejsou žádné makroskopicky viditelné známky vzrůstu, kdežto v bouillonu c) a d) je mikrob velmi dobře vyrostlý a v c) zvláště silně zapáchá (viz v kapitole sub. III. zmínku o zvláštní affinitě bacila *sporogenes* pro cystein). Jak viděti ověřují námi měřené Eh hodnoty i když jsme si vědomi nepřesnosti našeho měření, plně výsledky získané experimenty in vitro o rovnocennosti, ba dokonce jakési převaze ascorbové kyseliny v účinku na vzrůst anaerobů, za aerobních podmínek.

Chemismus tohoto nápadně příznivého účinku

ascorbové kyseliny na vznik anaerobů, nám chybí. Do jisté míry si ho představujeme tak, jako vykládá Frei působení cysteinu, což bylo citováno v úvodní části naší práce. Odchylka podle našeho názoru by mohla spočívat v tom, že ascorbová kyselina není donátorem vodíku, nýbrž že tím, že má tendenci měnit se za přístupu atmosférického kyslíku spontánně na svou reversibilně oxydovanou formu, strhává přímo na sebe kyslík, volně difundovaný v kultivační půdě a tím snižuje vznikovou latenci anaerobních mikrobů na minimum. Je-li tato domněnka pravdivá, pak by její účinek byl bezprostřednější nežli cysteinu, který svou oxydaci se stává donátorem vodíku a teprve tento vodík má schopnost vázati kyslík, kdežto kyselina ascorbová je přímým akceptorem kyslíku, což by vysvětlovalo její větší úspěchy na poli kultivace anaerobiontů za aerobních podmínek, nežli jsme tomu zvyklí u cysteinu. Oxydace ascorbové kyseliny jest však, jak známo, dějem reversibilním. Její část se vrací zpět na redukovanou formu a může být znova akceptorem kyslíku. Tím bychom si mohli vysvětliti, proč redukční účinek ascorbové kyseliny trvá déle nežli účinek cysteinu, jehož oxydace jest reakcí naprosto jednosměrnou.

Přímo analogické pokusy o ascorbové kyselině jsme, jak již uvedeno, nikde nenašli. V poslední době však byla publikována dvě sdělení, a sice od Arloinge, Morela a spolupracov., kteří vycházejíce z odlišných klin. pozorování, zjistili na experimentech se zvířaty proti svému očekávání, že vstřikování velikých dávek derivátů ascorbové kyseliny zhoršovalo (byť i podle našeho názoru problematicky) průběh anaerobních infekcí u morčat a králíků. V další práci pak zjistili, že přidání sloučenin ascorbové kyseliny ke kulturám vibrio septique v glykosovém bouillonu za přísně anaerobních podmínek zvyšovalo fermentační schopnosti tohoto

mikroba. Přes to, že jejich experimenty jsou naprostě odlišné od našich, můžeme je snad alespoň zčásti považovat za potvrzení našich nálezů.

Souhrnem můžeme tedy říci, že

1. v levotočivé ascorbové kyselině byl námi nalezen nový prostředek, který za poměru blíže v práci rozvedených, umožňuje pomnožování striktně anaerobních mikrobů a to i nejcitlivějších za podmínek aerobních.

2. Účinek ascorbové kyseliny v tomto použití se při nejmenším rovná analogickému účinku cysteingu, často jej však ještě předčí.

3. Podle našich zkušeností naprostě nelze tvrditi, že by ascorbová kyselina v námi užívaném kvantu, za neutrální, nebo lehce alkalické reakce poškozovala vitalitu, nebo produkci toxinu u mikrobů aerobních. Je-li schopna tak činiti, může to být pouze za podmínek v přírodě se nevyskytujících, t. j. v abnorálně velikých dávkách anebo při nepřirozeně kyselé reakci.

4. Za běžně užívaných podmínek nemá ascorbová kyselina příznivější vliv na produkci toxinu u anaerobních mikrobů, než-li na př. dosud užívaná glykosa. Může však potencovati velmi nápadným způsobem toxicitu anaerobů, je-li přidána k bouillonu současně s glykosou. Nepochybujeme i tom, že využití obou těchto faktorů by mohlo mít značný praktický význam.

5. Měřením oxydoredukčního potenciálu potenciometrickou cestou byly zjištěny pro bouillonové půdy s ascorbovou kyselinou přibližně stejně nízké minusové hodnoty, jako při měření půd s cysteinem. Redukční účinek vitamINU C však vytrvá déle, takže se pro praktické použití zdá být ascorbová kyselina vhodnější ke kultivaci anaerobů, nežli cystein. Příčinou této dlouhodobé redukční schopnosti jest snad částečná reversibilita oxydačního procesu.

6. Ascorbovou kyselinu jest možno použiti nejenom jako samostatný prostředek ke kultivaci anaerobiontů v tekutých půdách, nýbrž i jako přidatné látky k jakýmkoliv půdám ostatním, zejména krevním plotnám, čímž se znamenitě zvýší jejich schopnost pro kultivaci i nejcitlivějších, striktně anaerobních mikrobů tam, kde to bývá nejobtížnější, t. j. při isolaci z materiálu.

Ke konci jest mi milou povinností poděkovati panu MUDru Janu Ilavskému za jeho účinnou spolupráci.

### Résumé.

#### **Un nouveau procédé de culture des anaerobies strictes (par l'addition des substances chimiques réductrices, ajoutées au milieu de culture).**

L'auteur discute d'abord l'influence du potentiel, d'oxydoréduction ( $Eh$  et  $rH$ ) sur le développement des anaerobies strictes d'après les données de la littérature se rapportant à cet objet. Il résume le savoir contemporain sur les substances actives au point de vue biochimique et sur celles, plus simples, qui mises dans le milieu nutritif, rendent possible le développement des anaérobies strictes, même dans les conditions aerobies. Il explique le chimisme de leur action.

A ces matières, il en joint une qui, d'après les données bibliographiques n'a pas encore été utilisée dans ce sens en bactériologie, a savoir l'acide ascorbique. L'action de celui-ci consiste probablement à extraire l'oxygène diffus dans le milieu nutritif par son changement spontané en sa forme oxydée, et à abaisser le potentiel d'oxydoréduction du milieu jusqu'aux valeurs négatives, qui permettent le développement des anaérobies à l'abri de l'air. La quantité de l'acide recommandée par l'auteur est de  $1/2\%$  pour les milieux liquides, de  $1\%$  pour

les milieux solides; en même temps, le milieu est légèrement réalcalinisé ( $\text{Ph} = 7.2-7.4$ ). Les résultats obtenus avec l'acide ascorbique sont au moins égaux à ceux de la cystéine, souvent beaucoup plus favorables. Suivant les expériences, faites par l'auteur, l'acide ascorbique n'exerce, dans ces conditions, aucune influence défavorable même sur les microbes aérobies (ce qui va contre l'opinion généralement acceptée jusqu'à présent). Mais il se montre moins favorable à la production des toxines, que la glycose, couramment employé aujourd'hui, bien que son action sur le développement des microbes dépasse d'un multiple celle de la glycose. Toutefois, l'acide ascorbique joint au bouillon en même temps que la glucose augmente la production des toxines d'une manière bien frappante. L'utilisation des deux matières jointes pourrait être d'un usage pratique éminent. La détermination des potentiels d'oxydoréduction des milieux à l'acide ascorbique par voie potentiométrique a donné des valeurs négatives à peu près égales de la cystéine. Mais l'action réductrice de l'acide ascorbique dans les milieux est plus durable, ce qui semble la recommander pour les cultures anaérobies de préférence à la cystéine. L'acide ascorbique peut être utilisé non seulement en tant que moyen indépendant pour les cultures anaérobies dans les milieux liquides, mais aussi comme moyen supplémentaire pour les plaques de gélose au sang, sur lesquelles il est facile, en conséquence, de cultiver des microbes anaérobies les plus sensibles en appliquant des procédés d'une technique anaérobie quelconque.

#### Literatura:

- Arloing, Morel, Josserand, Thévenot:** C. r. Soc. Biol. **125**, 281 (1937). — **Arloing, Morel, Josserand, Thévenot:** C. r. Soc. Biol. **125**, 347 (1937). — **Aubertin, Aurel, Génevois:** C. r. Soc. Biol. **98**, 957 (1928). — **Bleyer:** Münch. med. Woch. **257** (1933). — **Cardoso:** C. r. Soc. Biol. **119**, 749 (1935).

— D'Antona: Ztrbl. f. Bakt. Ref. **114**, 427 (1934). — Franta: Č. l. č. **47**, 1472 (1936). — Frei: Ergebnisse der allgemeinen Pathol.: Allgemeine Biologie der anaeroben Bakterien. München 1936. — Frei, Riedmüller: Ztrbl. f. Bakt. Orig. **119**, 282 (1930). — Frei, Riedmüller: Ztrbl. f. Bakt. Orig. **121**, 92 (1931). — Gagyi: Klin. Wochenschr. **15**, 1936. — Grooten, Bezsonoff: Ann. de l'Inst. Past. T. **56**, 413 (1936). — Goldie: Ann. de l'Inst. Past. T. **48**, 179 (1932). — Hamsik-Richter, Wagner: Lékařská chemie. Praha 1931-33. — Hoder, Breuer: Zeitschr. f. Immunforsch. **70**, 279 (1931). — Jungeblut, Claus: Ztrbl. f. Bakt.. Ref. **120**, (1935). — Jungeblut: J. of exper. Med. **62**, 517 (1935). — Kishins, Shigaki: Ztrbl. f. Bakt. Ref. **99**, 187 (1930). — Knight: Ztrbl. f. Bakt. Ref. **11**, 419 (1933). — Koch: Ztrbl. f. Bakt. Orig. I., **132**, 358 (1934). — Kolle-Kraus-Uhlenhut: Handbuch der Path. Mikroorg. Zeissler: Bd. **X**, 1929. — Kolle-Kraus-Uhlenhut: Handbuch der Path. Mikroorg. Zeissler: Bd. **IV**, 1928. — Lepper, Martin: Ztrbl. f. Bakt. Ref. **101**, 39 (1931). — Long, Perrin, Olitzky: Ztrbl. f. Bakt. Ref. **98**, 483 (1930). — Mc. Conkey, Smith: J. exp. med. **58**, 503 (1933). — Mouriquand, Edel, Joly: Ztrbl. f. Bakt. Ref. **119** (1935). — Nešpor: Čas. l. č. **36**, 1130 (1936). — Nešpor: Biol. listy **1**, 49 (1937). — Nešpor: Biol. listy **2**, 118 (1936). — Plotz: C. r. Soc. Biol. **193**, 591 (1930). — Plotz, Geloso: Ann. de l'Inst. Past. **45**, 613 (1930). — Polonyi: Wien. med. Wochschr. **68** (1935). — Reymann: Ztrbl. f. Bakt. I. Orig. **108**, 401 (1928). — Scott, Brandley: J. Bact. **26**, 1, (1937). — Stepp-Kuhnau-Schroeder: Die Vitamine und ihre klinische Anwendung. Stuttgart 1937. — Wagner: Biol. listy, **1**, 6 (1934). — Weinberg et Ginsbourg: Données récentes sur les microbes anaerobies. 1927. — Weinberg, Nativelle, Prévot: Les microbes anaerobis. Paris 1937. — Wurmser: Oxydations et réductions. Paris 1930. — Wurmser, Loureiro: C. r. Soc. Biol. II, **543** (1933). — Wurmser, Loureiro: C. r. Soc. Biol. II, **101** (1934). — Wurmser, Loureiro: C. r. Soc. Biol. II, **583** (1934). — Wurmser, Kubo: C. r. Soc. Biol. **125**, 620 (1937).

---