

Zvláštní případ mikrobiálního antagonismu fermentativní povahy. *Polycoccus Honli.*

(Z bakteriologicko-serologického ústavu profesora MUDra Ivana Honla.)

Napsal

MUDr. Fr. Patočka,

asistent ústavu.

(Předloženo dne 5. února 1932.)

I.

Mikrobiální antagonismus je zjev velmi častý, ač je málokdy tak zřetelně vyznačen, aby byl beze všeho patrný. Nicméně i případy význačné vzájemnou reakcí, na první pohled zjevnou jsou zhusta popsány. Takový charakteristický antagonismus existuje jednak mezi druhy saprofytickými, jednak mezi druhy pathogenními a konečně mezi saprofyty s jedně a pathogenními parasyty s druhé strany. Je přirozeno, že jsme nuceni experimentálně reprodukovati tento zjev za podmínek kultivačních námí sestrojených, ale nepochybujeme o tom, že stejné procesy vzájemného antagonismu odbývají se v přírodě. Mohou se odbývat v napadeném organismu, jemuž antagonisticky působící mikrob přispěje na pomoc, a jsme i schopni vyvolati takový antagonismus uměle za účelem therapeutickým. Antagonistické působení dvou druhů mikrobiálních navzájem může být nejen rozličné quantity, nýbrž i quality. Nejjednodušší případ jest, že silný antagonista zabraňuje citlivému druhu po určitou dobu vyrůsti. Účinek podobného rázu, ale potencovaný, nastává tehdy, kdy silný antagonista svého druhu po delším účinku usmrnuje asi po způsobu antiseptik. Konečně nejsilnější a qualitativně poněkud odlišný účin záleží v tom, že druh podléhající jest produkty svého antagonisty úplně rozpuštěn, a to pochodem obdobným některým procesům fermentačním. Z uvedeného vyplývá trojí věcná podstata bakteriálního antagonismu. 1. V prvé řadě přímo

působí živoucí mikroby na jiné mikroby tak, že, rostouce rychleji nebo mohutněji, vyčerpávají ze vzrůstového prostředí výživné látky, čímž znemožňují vzrůst mikroba skrovnějšího a ve vzrůstu méně energického. Případ ten je nejvšeobecnější a bývá často kombinován tím, že mikrob mohutnější ukládá do kultivačního media své odpadové produkty výměny látkové, které mikroba slabšího přímo poškozují (Liesegang, Kappes). 2. S produkty výměny látkové antagonistického mikroba souvisí také druhý způsob účinku. Kumulací těchto produktů nastává škodlivá změna koncentrace vodíkových iontů prostředí, a to buď ve směru nadměrně kyselém nebo alkalickém. Také skutečně se někdy podaří prospěšnou změnou reakce takový antagonismus odstraniti buď jednoduchou neutralisací (Bitt), jindy zvýšenou temperaturou, jsou-li uvedené produkty labilní nebo prchavé (Perdrix, Frankland). Je jasné, že tyto poměry mohou v markantní míře nastati i v čisté kultuře antagonisty samotného, který je svými vlastními produkty brzděn ve vývinu. To je případ *isoantagonismu* na rozdíl od dosud popisovaného *heteroantagonismu*. 3. Třetí případ konečně, nejzajímavější s hlediska biologického i s hlediska speciálně pathologického (therapeutické využití), nastává tehdy, když antagonista secernuje do svého okolí specifické produkty, nejčastěji vázané na bílkovinu, které způsobem, jenž buď není blíže znám nebo má vysloveně fermentativní charakter, zabraňuje vzrůstu nebo docela rozpouští mikroba, podléhajícího jeho vlivu.

Je samozřejmé, že mluvíme-li o mikrobiálním antagonismu jako o zjevu zasluhujícím pozornosti a popisujeme-li zvláštního antagonisticky působícího mikroba, máme na mysli případy velmi výrazné, naprosto zřetelně a bez nesnází patrné. Popisujeme-li mikroba antagonistu, rozumíme tím ve většině případů antagonistu všeobecného, který působí jednak na celou řadu mikrobů a který dále jest schopen antagonistické funkce i bez přítomnosti druhu, na nejž by mohl svůj zhoubný vliv vykonávat. Osvětlen experimentem vypadá zjev tak, že kultivujeme-li antagonistu tohoto druhu v tekutém prostředí a pak ho nějakým způsobem odstraníme (na př. filtrací), chová se medium, jež po něm zbude, stejně jako antagonista sám. Naočkujeme-li do něho citlivého mikroba, zůstává ve vzrůstu pozadu nebo je rozpouštěn. Věc se snadno vysvětuje z uvedených již všeobecných příčin antagonismu. Buď tedy je prostředí vyčerpáno t. j. náročným vzrůstem antagonisty zbaveno výživných látek (v takovém případě může být přidáním živin regenerováno), nebo má trvale změněnou reakci, anebo konečně obsahuje zábranné produkty výměny látkové nebo lytické fermenty. Často se stává, že inhibiční působnost kultivačního prostředí po odstranění antagonisty je mnohem slabší, nežli byla za jeho přítomnosti. To může mít několik příčin. Tak v případě změny reakce a sekrece zábranných nebo dokonce lytických látek může obé být způsobeno produkty prchavými (změna reakce amoniakem nebo kyselinou uhličitou), které již při normální temperatuře vymizí, nejsou-li stále obnovovány. Jindy jest příčinou zeslabení jevu způsob, jímž byl antagonista odstraněn. Nej-

častěji se tak děje filtrací kaolinovou nebo infusoriovou svíčkou, která velmi snadno zadržuje adsorbcí nejrůznější látky buď bílkovitého charakteru nebo alespoň vázané na molekulu bílkoviny, jsoucí v koloidním roztoku. Antagonismus tohoto rázu, vyvolaný v každém případě životním dějstvím antagonisty, ať již jest přítomen citlivý objekt, na nějž by se působnost vztahovala, či nikoliv, nazýváme *antagonismem přirozeným*. Ten patří mezi základní a normální biologické vlastnosti čistých kultur mikrobů svého druhu, asi tak, jako tvorba nejrůznějších pigmentů, sekrece toxinů a fermentů u jiných druhů bakteriálních. Známe však také, zejména z prací Schillerových, celou řadu mikrobů grampositivních i gramnegativních, kvasinek a mikrobů vláknitých, které za normálních okolností zřetelně antagonisticky nepůsobí, nýbrž pouze tehdy, jsou-li k tomu zvláštním zařízením experimentu donuceny, v přírodě pak speciální shodou okolností — odtud Schillerův termin *antagonismus vynucený*, na rozdíl od přirozeného. Podobná pozorování byla učiněna již před tím Rosenthalem; potvrdil i doplnil je později Gratia.

Vynucený antagonismus je zjev velmi zajímavý, svědčící o veliké adaptační schopnosti bakteriálního protoplasmatu, nejen v příčině tvaru, nýbrž zejména ve funkci. Vrátíme se k vynucenému antagonismu ještě dodatečně, abychom prostudovali celý proces na konkrétních případech. Zatím jest na místě uvést některé zvláště nápadné nebo v pathologii a epidemiologii důležité antagonisty. Prvé takové případy byly popsány Babesem a týkají se zejména antagonismu vyvolaného převahou vzrůstu. Tak velmi četné mikroby saprofytické a z pathogenních příkladem i relativně slabě rostoucí streptokok jsou antagonisty bacila morového, ačkoli tento jest méně náročný na kultivační prostředí, než streptokok sám. Je to nejspíše způsobeno velmi pomalým vzrůstem bacila moru (první kultura potřebuje 48 hodin, kdežto streptokok 24 hodin). Příklad zároveň názorně ukazuje, jak může býti antagonismus zjevem pouze relativním. Zbraňovací pochod nastává totiž pouze při vyšších teplotách. Při teplotách nižších, kolem 12° , nemá morový bacil, prakticky vzato, téměř žádných antagonistů, neboť i streptokok i antagonisté saprofytičtí zůstávají za této temperatury nevyvinuti. Vibrio cholerae účinkuje brzdivě na stafylokoků a anthrax. Vibrio Finkler jest antagonistou vibriona cholerae. Zvláštní coccus popsaný Mečníkovem zabraňuje rovněž vzrůstu vibrio cholerae. Streptokoky utlumují vzrůst tuberkulosních bacilů (Bonhoff). Značně mohutným antagonistou je bacillus prodigiosus, který je zejména silně aktivní proti bacilu červenky vepřů. Známý a velikého významu jest antagonismus bacteria coli jednak proti bacilu tyfovému, jednak proti hnilobným mikrobům střevním. Antagonismus bacteria coli proti bacilu tyfovému, zejména při kultivaci ze stolice, je tak nápadný, že značně zmenšuje diagnostické možnosti. Že nezáleží pouze snad na větší vitalitě a mohutnější schopnosti vzrůstové, dokazují pokusy velmi četných autorů, z nichž zejména Conradi a Kurpjuweit pokoušeli se isolovat z bouillonových kultur bacteria coli

látky, jež nazývají autotoxiny. Tyto látky jsou z větší části zadrženy při filtraci svíčkou. Schilling a Califano opakovali tyto pokusy způsobem velmi přesným, při čemž se jim podařilo dokázat, že ono inhibiční agens isolováno ve filtrátu působí i na jiné mikroby střevní, na př. na dysenterii typu Shiga-Kruse, a to intensivněji nežli na tyfus sám. Výživné látky v tomto případě nejsou vzrůstem *bacteria coli* zcela vyčerpány, neboť jiná kultura téhož mikroba tam roste zcela nerušeně. Blížší údaje o vlastnostech těchto produktů *bacteria coli* nejsou od autorů uvedeny. — Působení *bacteria coli* proti hnilobným mikrobům ve střevě zdá se být jiného rázu. Skutečně také někteří autoři, aby vystihli zvláštní ráz tohoto antagonismu, mluví o *antagonismu funkce* na rozdíl od běžného antagonismu vzrůstu. Nejde zde totiž o jednoduchou vývojovou inhibici nebo docela lytický účin, nýbrž o fakt, že antagonistický účinek je založen na specifickou funkci citlivého mikroba. I takových případů buď rudimentárních nebo markantních je známo více. Tak na příklad některé hnisavé koky zabraňují tvorbě pigmentu bacila *pyocynea*, nevykonávajíce nijakého zhoubného vlivu na jeho vzrůst a pathogenní účinek. Virulence bacila *anthraxu* bývá snížena, pěstujeme-li ho ve sterilisovaných kulturách *vibrona cholerae* (Zagar). — Význačným příkladem isoantagonismu (str. 2) je ku př. bacil červenky vepřů, který mění vlastnosti bouillonu, v němž vyrůstá, takovým způsobem, že jiná kultura téhož mikroba zde roste velmi chabě nebo vůbec neroste, podléhajíc hned od počátku dosti rychlému rozpouštění. Dle některých autorů (Nicolle-Boquet) filtráty *subtilis* rozpouštějí prý pneumokoka, bacila maleu, někdy i dysenterii druhu Shiga. O tom, že kvasinky nejrůznějších druhů jsou dobrými antagonisty gram-positivních i gramnegativních mikrobů, svědčí případy četně uváděné v literatuře, která zejména se ovšem zabývá praktickým využitím tohoto zjevu. Teoreticky patří však tento úkaz do kategorie antagonismu vynuceného, pročež šíře bude popsán později. Jedním z nejdůležitějších příkladů antagonismu, spočívajícího na změně reakce a na produkci látky s mírným antiseptickým účinem, jsou mikroby známé jako producenti kyseliny mléčné: *bacterium lactis aerogenes*, *bacillus acidi lactici*, zejména však grampositivní mikrob *majabacillus* čili *bacillus bulgaricus* (Mečníkov).

Klasickým zjevem a možno říci prototypem mikrobiálního antagonismu je případ bacilla *pyocyanea*. *Bacillus pyocyanus* je z mikrobů dosud známých nejsilnější antagonistický přirozený. Jeho vlastnosti byly pozorovány *in vitro* Emmerichem a Löwem a nezávisle na nich, téměř současně prokázány Honlem, jemuž také patří nesporná, v nové době plně uznávaná zásluha o to, že svůj objev, učiněný přímo na torpidních případech běrcových vředů, nejen potvrzel experimenty *in vitro*, nýbrž první využil therapeuticky. Antagonistický účinek *pyocyana* jest velmi komplexní a podnes není uspokojivě vysvětlen. Dle všeho se zdá, že se zde kumulují všechny tři složky, jež podmiňují antagonistické působení, zejména ovšem složka poslední, t. j. přímá sekrece inhibičně působících

látek. *Pyocyaneus* nepůsobí tedy pouze sám, za svého vzrůstu, nýbrž i v preparátech získaných ze starších kultur. Je známo, že bacillus *pyocyaneus* secernuje velmi četné fermenty exogenní, v prvé řadě fermenty sacharolytické, dále mohutně účinkující enzymy proteolytické, jež působí na př. nejen na gelatinu, nýbrž i na ovalbumin, casein a fibrin. Některými autory byla pozorována sekrece labfermentu; konečně na speciálně připravených půdách dokázány oxydaza a redukaza. Není tedy divu, že u mikroba, oplývajícího takovým bohatstvím fermentů, pomýšlelo se hned od počátku na antagonismus způsobený produkci fermentů proteolytických i speciálních, a to tím spíše, že účinek *pyocyanina* i jeho produktů je nejen inhibiční, nýbrž i vysloveně bakteriolytický. Skutečně také účinné preparáty z *pyocyanových* kultur, zejména byly-li připraveny studenou cestou, mají in vitro dokázatelné vlastnosti proteolytických fermentů. Brzy se však ukázalo, že antibakteriální a bakteriolytické vlastnosti *pyocyanových* produktů vzdorují teplotám i kolem 100°; fakt ten dokázal velmi časně i Honl, jenž připravuje svůj *pyocyaneoprotein* způsobem sice relativně jemným, přes to však postačitelným ku zničení většiny dobře známých enzymů. Dodatečně pak, pokusy Raubitschka a Eguchiho, podařilo se z účinného filtrátu *pyocyanové* kultury isolovati látky lipoidní povahy (snad příbuzné s *pyocyanovým haemolysinem*), o kterých tvrdí, že tvoří podstatu aktivní látky mikroba. Údaje experimentální o síle zábranného působení bacilla *pyocyanea* jsou velmi různé, jistě však šíře jeho účinku jest značná. Nejslabší stupeň jest prostá zábrana vzrůstu; tato se může stupňovat v úplné usmrcení mikroba, na nějž působí. Na sporulující mikroby, zejména bacila anthraxu, působí často tak, že zabraňuje tvorbě spor. Byly-li tyto již vytvořeny, zamezuje jejich vyklíčení. Maximum účinku je charakterisováno více nebo méně rychlým rozpouštěním vegetativních forem sdruženého mikroba (Fortineau, Blagobečenskij). Silvestrini tvrdí, že účinné látky *pyocyanina* působí inhibičně i na toxiny. Udává se, že v experimentu na zvířeti dosaženo prý i tak překvapujících výsledků, že morčata, infikovaná anthraxem, byla zachována při životě, byla-li jim krátce po imokulaci vstřiknuta kultura virulentního *pyocyanina*. Ale tento údaj se zdá málo věrohodným, neboť infekce i nepatrným quantem virulentní kultury pokračuje nesmírně rychle, kdežto antagonistický účinek i nejmarkantnějšího rázu vyžaduje dosti dlouhé doby. Spíše lze věřiti údajům Fukudovým, který dosáhl pouhého prodloužení inkubační doby. Velmi příznivé jsou výsledky získané buď experimentálně nebo klinicky působením *pyocyanina* či jeho produktů na bacila červenky vepřů. Stejně dobré zkušenosti byly učiněny in vitro i in vivo při působení *pyocyanina* na hnisavé mikroby. Účinek tak nápadný a všeestranný nemohl zůstat nepovšimnut při snaze o rozhojňování therapeutických prostředků u mikrobielních affekcí lidských. *Pyocyaneus* sám jest ovšem považován za mikroba pathogenního pro člověka, byť i jeho virulence byla velmi kolísavá. Nebylo tedy možno používat jeho živých kultur, jako v některých

experimentech na zvířeti. Ostatně toho nebylo ani zapotřebí, neboť jeho exkrety účinkují téměř stejně jako mikrob sám. Jak již uvedeno, byl první Honl, který svým pyocyanoproteinem docílil pozoruhodných výsledků v terapii torpidních běrcových vředů. Dodnes se jeho produktu s úspěchem používá v profylaxi a terapii affekcí laryngu a tonsil. V době zcela nejnovější jest s význačným effektem přidáván do antivirů streptostafylokokových (Feierabend). Z podobných produktů dlužno ještě uvésti pyocyanazu dle Emmericha a Löwa, používanou při affekcích hnisavých, při procesech putridního rázu. Mínění o její ceně se velmi různí, zejména asi proto, že preparát tak, jak se vyrábí v nejrůznějších laboratořích, značně kolísá v účinku. Prakticky bylo rovněž využito antagonismu *bacteria coli* proti ostatní střevní floře v preparátu Mutaflor Nislem.

Lytickým účinkem svých sekrečních produktů blíží se pyocyanovi, ač v intensitě a všeestrannosti ho ani zdaleka nedostihují, některé gram-positivní sporulující mikroby ze skupiny subtilis. O bacillu subtilis stala se již zmínka p. 4. *Bacillus mycoides* působí podobně, zejména na mikroby ze skupiny dysenterie (Kimmelstiel). Bacily příbuzné mesentericu: *tyrothrix scaber*, *t. minimus*, *t. geniculatus* rozpouštějí zejména vibriony cholery (Rosenthal, Nicolle-Boquet). Gratia našel antagonisticko-lyticke vlastnosti v různém stupni význačné u různých druhů streptothrix. Tím je výčet mikrobů s přirozeným antagonismem zhruba vyčerpán.

Antagonismus vynucený byl již definován p. 3; vyjádřeno vlastními slovy Schillerovými jde v případech toho druhu o vhodnou volbu speciálních podmínek, za nichž bakterie, které obyčejně se dobře pohromadě snášejí, jsou donuceny k existenčnímu boji, při němž druh silnější stravuje druh slabšího. Takové podmínky možno experimentálně připraviti nevhodněji tím, že naočkujeme dobře rostoucí druh určitého mikroba na bezdusíkaté prostředí (vodní agar, fysiologický roztok) a přidáme jiného mikroba v menším quantu. Podmínky, závislé při experimentu na uspořádání umělém, nastávají nepochybně velmi zhusta v přírodě samé. Situace v experimentu jako v přírodě je charakterisována hlavně naprostým nedostatkem dusíku. Je tedy nucen vitálnější mikrob zaopatřovati si jej z protoplasmy mikroba druhého: vylučuje pak při tom fermenty, které praeexistují určitě v jeho protoplasmatu, ale nejeví se jindy nijak zřetelně ve svém okolí. Tyto fermenty slabšího druhu natravují (což bývá zejména dobře vidět ztrátou grampozitivity mikrobů), usmrcují, rozpouštějí a při tom získaného dusíku používají k regeneraci své vlastní protoplasmy. Tak se chovají ku př. kvasinky nejrůznějších druhů, jsou-li kultivovány za přítomnosti grampozitivních i graminnegativních mikrobů v prostředí chovajícím sice uhlohydráty, ale žádný dusík. V prostředí, neobsahujícím ani dusíkatých látek ani uhlohydrátových, jsou naopak stravovány kvasinky od bakterií. Grampozitivní proteolytické mikroby, kultivovány na vodním agaru, nebo na tekutém prostředí bez dusíku s nejrůznějšími kokami, zbabují je grampozitivity, virulence a konečně rozpouštějí je úplně.

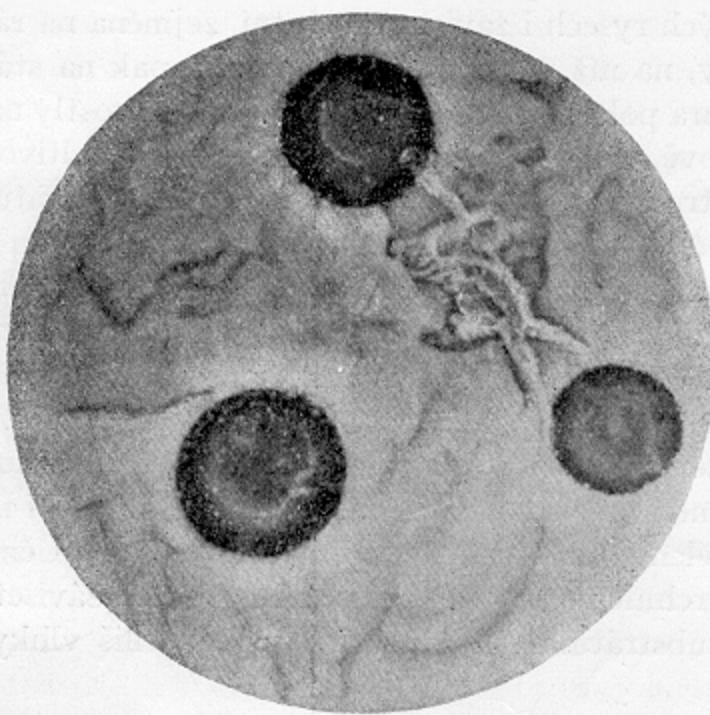
Dle nejnovějších pokusů (Schiller 1930) může bacillus subtilis v bezdusíkatém prostředí poškozovati, až úplně rozpouštěti bacila tuberkulosy. Ve všech těchto pokusech jest tedy dusík tou látkou, o níž je sváděn boj a jejíž nedostatek dělá z mikrobů jinak neškodných či pouze nepatrně vitálnějších mohutné antagonisty. To zavdalo Gotschlichovi i jiným příčinu k tomu, že identifikují nesprávně vynucený antagonismus s bojem o dusík. V podstatě je problém mnohem širší. Stejně jako nedostatek dusíku může působiti nedostatek kyslíku, vlhkosti neb prostoru vůbec. Podobný zjev, týkající se však natravování mikrobů mrtvých, popsal nezávisle Gratia a nazval heterofagie, na rozdíl od isofagie, při které jest mrtvý mikrob natravován živými individui svého vlastního druhu. Autoři pokusů o vynuceném antagonismu soudí, že jest chemismus působení vynucených antagonistů rozdílný od chemismu antagonistů přirozených. Děje-li se inhibice vzrůstu mikrobiálního a docela i rozpouštění mikrobů produkty thermostabilními blíže neznámého charakteru u antagonistů přirozených, jsou působivou látkou antagonistů vynucených prý typické thermolabilní fermenty, přirozeně z největší části proteolytického charakteru. Některí činí z přirozeného antagonismu dedukce velmi rozsáhlé a odvážné, tvrdíce, že jest prvním a primitivním článkem fylogeneze immunity, jež se v dokonalém způsobu vyskytuje u tvorů výše organizovaných.

II.

Z výčtu všech význačných případů, které v literatuře uvedeny, je patrno, že antagonisticky působící mikroby, vyjímaje případ streptokoka a bacila moru, dále pak streptokoka a bacila tuberkulosy (kteréžto případy však nejsou nikterak specifické a nijak charakterisované speciálními sekrečními produkty) jsou mikroby tyčinkovité. V dalším popíšeme antagonisticky působícího koka, tedy úkaz vzácný, s mohutně a velmi všeestranně vyvinutým antagonismem přirozeným, způsobeným speciálními sekrečními produkty odlišného charakteru. Podobný případ byl před námi popsán pouze jednou (Benecke — Lode), ale způsobem neúplným a neurčitým. Mimo to dle morfologie Lodem popsáного antagonistu je patrno, že byl to kok tvarově rozdílný, jehož působnost se zdá být kvantitativně i druhově odlišná od mikroba nově popisovaného. Jelikož jsme v žádné z běžných bakteriologických systematik nenalezli zmínky o koku námi isolovaném, můžeme míti právem za to, že nepatří mezi mikroby běžně známé a pojmenované. Dovolili jsme si ho proto pojmenovati a označiti jménem našeho učitele a zakladatele české bakteriologie jako „*Polycoccus Honli*“. Svým zjevem na kultivačních půdách není naprosto nijak nápadný a je pravděpodobno, že kdyby byl vznikl v čisté kultuře, byl by ušel naší pozornosti. Náhodou byl však isolován z bakteriální směsi, ze které na první pohled markantně vynikal svým

mocným inhibičním působením na mikroby v okolí. Při vyšetřování jedné studniční vody vyrostly nám na gelatinové plotně kolonie *bacteria fluorescens liquefaciens* s velmi intensivním pigmentem. Chtěli jsme schovat fluorescens pro ústavní sbírku, jelikož však se nám nezdál být zcela čist, rozočkovali jsme jej za příčinou isolace na agarových plotnách. Na jedné z nich se vyskytl nápadný zjev. Souvislá plocha fluoreskujícího mikroba byla na několika místech přerušena přísně okrouhlými, sterilními místy velikosti pětihaléře a desetihaléře, uprostřed nichž vyrůstaly bělavé kolonie jiného mikroba. Bylo na snadě, že jest onen mikrob příčinou sterilních kruhů, a to asi tak, že vylučuje antagonisticky působící látku, která defunduje do okolí přesně centrifugálně. Na sterilních kruzích nebylo lze zjistiti mikroskopicky přítomnost žádných mikrobů, ačkoliv byl fluorescens rozetřen po celé ploše agaru stejnomořně. Dedukce jsou jasné: onen neznámý mikrob, kterého jsme vyisolovali postupným ředěním a rozočkováním kultury fluorescense, vysílá účinný princip difundující v agaru do určité vzdálenosti v okolí, který nejen má schopnost zabránit vzniku bakteria fluorescens, nýbrž podle všeho jedince, jsoucí v okruhu jeho působnosti, rozpouští. Ačkoliv byl zjev nesporný a jeho vysvětlení se přímo nabízelo, pokusili jsme se přezkoušeti ho i jinak při umělém experimentálním napodobení okolnosti, za nichž byl spozorován, a to jednak na témže *b. fluorescens*, jednak na četných mikrobech jiných, zejména chromogenních saprofytech. Experimentální zařízení bylo asi takovéto: Čistá agarová kultura, pokud možná mladá, *bact. fluorescens liquefaciens*, *b. putidum*, *bac. Indicus ruber* a *b. prodigiosus* emulgována v bouillonu nebo fysiologickém roztoku a z této emulze naneseno několik kapek na agarovou plotnu. Kapky rozetřeny Drigalského tyčinkou stejnomořně po celém povrchu tak, aby na kontrolní plotně vyrostl souvislý mikrobiální povlak. Na plotně určené k experimentu nanesena na několika místech vpichovou jehlou nebo drobnou kličkou kultura antagonistického mikroba přeočkovaného z původních kolonií. Po inkubaci 2—3 denní ve studeném thermostatu (20°C , neboť v experimentech jde o chromogenní saprofyty) objeví se naprosto charakteristický zjev: hustý, úplně souvislý povlak chromogenního mikroba je přerušen sterilními kruhy o průměru, kolísajícím mezi několika *mm* až do velikosti padesátihaléře, uprostřed nichž vyrůstá bělavý houfeček kolonie antagonisty. Fenomen je často kombinováno velmi zřetelnou reaktivní zonou mohutnějšího vzniku postiženého mikroba, která začíná asi tam, kde končí účinek secernovaného principu, tedy na hranicích sterilní zony. Sterilní okrouhlá místa se chovají různým způsobem. V řidších případech za okolnosti, jež dál objasníme, přerůstají po čase mikrobem, jenž byl na nich naočkován a kterému dokázal účinný princip pouze po určitou dobu zabránit ve vzniku. Jindy, a to častěji, zůstanou ona místa dokonale sterilní, ani přeočkováním, ani cestou mikroskopickou nelze na nich dokázat mikroba, jenž byl také v jejich rozsahu nanesen.

Stejným způsobem, jaký právě popsán, zkoušena antagonistická účinnost polykoka na mikrobech pathogenních za úplně stejného experimentálního zařízení, až na teplotu inkubace. Účinek zkoušen na mikrobech z ústavní sbírky, jichž použito i pro všechny ostatní pokusy. Mezi nimi jest haemolytický streptococcus isolovaný z krve, staphylococcus pyogenes aureus isolovaný z flegmony orbity, bacterium pyocyaneum isolované z moči, vibrio cholerae Asiatica, bacterium typhi abdominalis z krve, bacterium coli ze stolice, bacillus anthracis z maligní pustuly pacienta na Bulovce, proteus vulgaris isolovaný z nekrotického abscesu při mastoiditidě. — Všechny popsané mikroby rozočkovány z dosti husté emulze



Obraz č. 1.

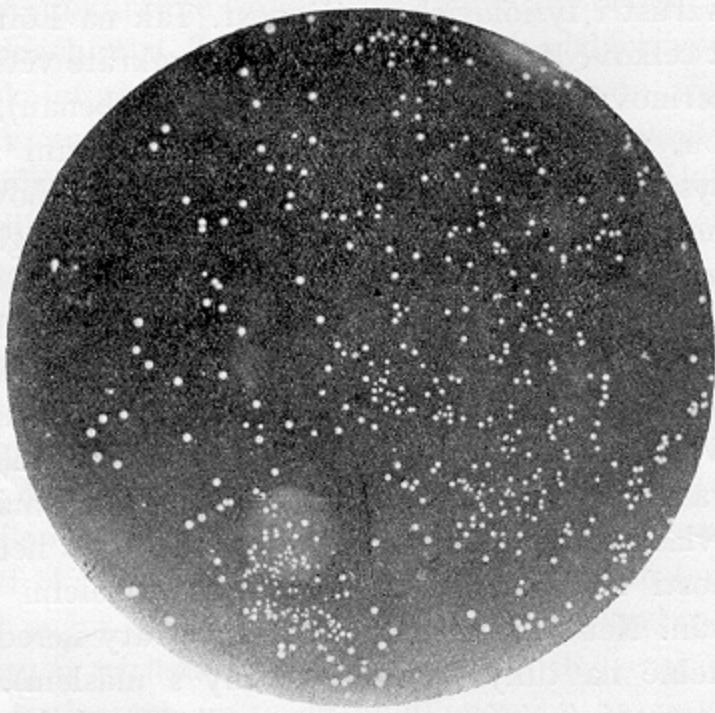
Drigalského tyčinkou na agarovou plotnu, načež jako u chromogenních saprofytů nanесена na místa několik *cm* od sebe vzdálená kultura polykoka vpichovou jehlou. Plotny inkubovány při temperatuře 37°. Ve většině pozorován stejný fenomen, jako u mikrobů saprofytických: sterilní místa dosti přesně okrouhlá ve větších či menších vzdálenostech od vzrostlé kolonie antagonisty. Rozhodně nejmarkantnější byl účinek u anthraxu, hned po něm co do citlivosti staphylococcus (obraz č. 1). Tak u anthraxu byla sterilní místa v rozsahu padesátihaléře až koruny, u stafylokoku pěti- až dvacetihaléře. U streptokoku byla působnost podstatně menší, v okruhu průměru několika *mm*. U mikrobů ze skupiny typhus-colí byla působnost sice zřejmá, ale o průměru rovněž malém. U vibriona cholery inhibiční působení zřetelné. U pyocyana působnost omezena buď na zcela úzký proužek sterilní nebo partii širší s velmi oslabeným vzhřustum. Proteus pak jest jediným mikrobem v našich pozorováních, který zůstával zřetelně neovlivněn,

ač i zde tu a tam pozorováno pásmo méně zřetelného vzhledu, ohraničené svrchu popsanou reaktivní zonou. U *bacteria coli*, břišního tyfu, u *vibriona cholerae* a zejména u *pyocyana* zarůstají zhusta sterilní místa po delší kultivační době naočkovaným mikrobem, jehož vitalita zřejmě překonala sílu inhibičního principu antagonisty. U *anthraxu*, stafylokoku a streptokoku sterilita oněch segmentů zůstává nedotčena. Již v těchto pokusech bylo jasně pozorovati — což právě je zcela pochopitelné — že účinek je nepřímo úměrný quantu mikroba, jenž byl vysazen antagonistickému účinku. O tom, že se zdá na základě zkušeností mikroskopických i kultivačních, jakoby docházelo nejen k inhibici, nýbrž i rozpouštění, bylo již referováno. Konečně pak již v těchto počátečních pokusech prostudovány v hrubých rysech i závislosti ostatní, zejména na rázu a výživnosti kultivační půdy, na níž pěstován *polycoccus*, a pak na stáří této kultury. Čím starší kultura polykoka, tím méně působivá. Vyrostlý na půdě bílkovité (na př. Löfflerově seru) je rozhodně účinnější, než kultivovaný na agaru. Konečně je patrno, že jedním z nejdůležitějších momentů jest vzájemný poměr v určitém vzhledovém stadiu. Byl-li naočkován *polycoccus* na čerstvě rozočkovanou kulturu citlivého mikroba, je působení maximální. Stačí však vložiti naočkovanou plotnu na jednu či dvě hodiny do thermostatu, aby účinek antagonisty přidaného po této době byl minimální. Na plotně vyrostlé kultury účinkují nekonstatně a velmi nepatrně. Zdá se, že, třebas vzdáleně, podobá se charakter účinu, byť byl málo lytický a velice inhibiční, fenomenu způsobenému bakteriofagem. Působí na formy mladé, ev. jsoucí v dělení, nikoli na tvary zplna vyrostlé. Účinný princip difundující v povrchových vrstvách agaru nemůže než záviseti na fyzikálním stavu tohoto substrátu. Příliš vysušený nebo příliš vlhký agar činí zjev nezřetelným.

Účinná látka, vylučovaná mikrobem, přímo vyzývá, aby její působení bylo zkoušeno v tekutém prostředí, aby byla od mikroba isolována a prozkoumán její charakter. Je přece z úvodní části patrno, že velmi často jsou zkonstruovány pouze domněnky o antagonistech a látky skutečně působivé (*pyocyaneus*, *tyrothrix*, *subtilis*) nejsou zařazeny do žádné ze známých skupin inhibičně působících látek, zejména pak nepatří mezi fermenty. Dříve ještě, nežli shrneme výsledky svých pokusů konaných za účelem podrobného studia samého principu, popíšeme zevrubněji morfologické a biologické vlastnosti polykoka.

Polycoccus Honli je grampositivní, dosti polymorfní coccus, jehož jednotlivá individua jsou asi zvici stafylokoků. Z tekutých půd jeví se seskupen v houfečky asi jako u stafylokoků; vzhled pozorován ve visuté kapce jeví se takto: jedinec se rozdělí, načež obě individua zůstávají při sobě jako pneunokoky, třetí a čtvrté dělení postupuje ve formě tetrad, z nichž se vytváří dodatečně nepravidelné, kompaktní houfečky, jež dosáhnuvše určité velikosti, klesají těhou ke dnu. V preparátech z tuhých půd jest seřazen v útvary tetradovité nebo i trojrozměrné, podobné sacci-

nám. V tekutých půdách, zejména s přidáním bílkovin, jeví jednotlivá individua značné kolísání co do velikosti, někdy i co do tvaru (vyskytuje se formy méně okrouhlé, spíše jemně hranaté). Podle všech jeho charakterů jde o mikroba ze skupiny mikrokoků. Je nepohyblivý, nemá pouzdra, není acidoresistentní. Při určování vlastností kultivačních řídili jsme se požadavky, uvedenými v tabulce pro určování mikrobiálních druhů, sestavené A. Berthelotem (Institut Pasteur). Ovšem některé biologické reakce tam udávané, ku př. s aminokyselinami, nám byly pro vysokou cenu naprosto nedostupné, jiné pak jsme nemohli provésti pro chemickou komplikovanost. Ostatně jeho hlavní biologický charakter, sekrece anta-



Obraz č. 2.

gonist. principu vysoké účinnosti, je tak význačná, že polycoccus nemůže být zaměněn s žádným jiným druhem jemu tvarově i kulturelně blízkým. Roste dobře při temperatuře 22° , o něco rychleji při temperatuře 37° , vzrůstové optimum kolem 28° . Jest schopen vyvinouti se však i při teplotě 15° a 16° . Nejvyšší temperatura, při níž se pomnožuje a secernuje účinný princip, jest kolem 45° . Při 61° zastavuje vzrůst, usmrcovan jest vlhkým teplem mezi $75 - 80^{\circ}$, trvajícím alespoň 1 hodinu. Temperatura — 5° mu nijak zřetelně neškodí. V obyčejném bouillonu při temperatuře 22° tvoří během prvních 24 hodin diffusní zákal, který po 48 hodinách počíná sedimentovat, takže po 3 nebo 4 dnech najdeme bouillon úplně čirý s jemným, nepříliš kompaktním sedimentem na dně (sedimentu je méně, než u streptokoka). Na agaru vyrůstá v koloniích patrných již po 12 hodinách, které, jsou-li volně od sebe vzdáleny, dosahují maximálního průměru 2—3 mm (obraz č. 2). Ze začátku jsou podobny koloniím streptokokovým,

ale méně průhledné. Později jsou differencovány na centrální hutnější zonu, s průsvitnější periferií. Prominující centrum velkých kolonií jest zbarveno žlutavěhnědě. Malým zvětšením jeví se povrch kolonií jemně granulován. Na gelatinových plotnách roste podobně jako na agaru. Vpich do gelatiny je zrníčkovitý, gelatina není zkapalňována. Na Sabouraudově agaru roste velmi dobře. Na bramboře vzrůst téměř neviditelný. V mléce roste *Poly-coccus* dobře, nemění je. V lakkusové syrovátce působí intensivní zčervenání. V peptonové vodě se vyvíjí o něco méně dobře než v bouillonu, ale stejným způsobem. Nápadné jest u mikroba isolovaného z vody, že na půdách obsahujících hojně bílkovin roste mnohem lépe a mohutněji, než na půdách obyčejných. Přidání ascitu, sera krevního nebo defibrinované krve favorisuje nápadně jeho vzrůst i fysiologickou účinnost. Tak na Löfflerově koagulovaném seru jest celkové kvantum mikroba asi dvakrátě větší, na vaječných půdách s glycerinovým bouillonem (Dorset — Lubenau), třikrátě větší za stejnou dobu, než na obyčejném agaru. Lidské ani zvířecí krvinky nejsou haemolysovány, haemoglobin je však proměňován v širokém okruhu v zelenou, později hnědnoucí massu (methaemoglobin?). Přidání cukru rovněž zlepšuje jeho vzrůst, ale ani zdaleka tak, jako bílkoviny. O tom, jak dovedou proteiny potencovat jeho biologické vlastnosti, svědčí na př. fermentace cukru; ta jest mnohem rychlejší, intensivnější, všeobecnější v prostředí bílkovitém nežli bez něho. Vzrůstové optimum pH je při 7,2. V normálních hranicích roste mezi pH 6,8 a 7,7. Při pH 6,3 jest vzrůst sotva patrný a nad pH 7,8 rovněž upadá. Nemá in vitro vůbec dokazatelných vlastností proteolytických. Rovněž jsme nemohli prokázati zřetelně vlastnosti acidaminolytické. Žlučovými solemi ani žlučí není zřetelně atakován. Neutrální červeň nemění, nitráty nereduкуje, in vitro neúčinkuje zřetelně na tuky (agarové plotny s máslem). V minerálním syntetickém prostředí (užíváno tekutiny podle Berthelota pro mikroby acidaminolytické), kde dusík a uhlík jsou dodány příměsí buď coffeinu nebo močoviny, konzervuje se sice dlouho na živu, ale stěží lze pozorovati jakékoli pomnožení. Ale kdežto mikrob vůbec není proteolytický a ani štěpící účinek na lipoidy nedá se dokázati, jest zato maximálně sacharolytický. Zkvašuje snad všechny známé mono- i polysacharidy, dokonce i celou řadu glykosidů. Pokusy se zkvašováním cukru konány v peptonové vodě, a to ve 2 rourkách: jedné obyčejné, ke druhé přidány 2 kapky nativního králičího sera; indikátorem byla lakkusová tinctura. Jak shora popsáno, nastalo štěpení cukru v peptonové vodě se serum téměř pravidelně již po 24 hodinách a po dalších 24 hodinách, ev. po 72 hod. bylo již všude zřetelně vyznačeno. V prosté peptonové vodě nastalo zřetelné zkvašování někdy až po 48 hodinách a maximu dosáhlo po 96 hodinách. Z běžných cukrů promptně štěpí glucosu, fructosu, galaktosu, laktosu, maltosu, sacharosu, raffinosu a manit. Štěpen je glycerin. Jediný isodulcit zůstává za všech okolností nedotčen. Škrob jest štěpen pouze v prostředí s nativní bílkovinou. Z glycosidů je zkvašován arbutin, floridzin po delší době

(7.—9. den), esculin, při čemž se vytváří sraženina, jež po přidání ferrumcitrátu zčerná. Inulin nedotčen. Produkce kyselin ze zkvašovaných cukrů je velmi mohutná. Tvorba plynů nepatrná. Polycoccus jest obligátně aerobní, v prostředí striktně anaerobním se vůbec nepomnožuje, ve Veillonově agaru roste pouze v povrchní vrstvě. Pathogenita pro zvíře jest prakticky rovna nule. Velké dávky kultury, aplikovány jakoukoli cestou bílé myšce, kryse či morčeti v pokusech mnohokrát opětovaných, nevyvolávají žádného pathogenního účinku. Stejně je to u králíka; při subkutánní aplikaci se vytvářejí v místě vpichu zatvrdliny, které během 10 dnů beze stopy zmizí. Aplikace subkonjunktivální nebo na skarifikovanou rohovku nevyvolává žádných změn mimo lehkou, přechodnou konjunktivitu. Vstřiknut subkutánně člověku, dělá zánětlivý oedem, dosti bolestivý, který po 48 hodinách mizí. Z pokusů na pevných půdách vyplynul základní poznatek o fysikální podstatě účinného principu: je to zřejmě dobře rozpustná látka (ev. směs látek), diffundující rychle do okolí, jsouc secernována polykokem při jeho vzrůstu a pomnožování asi tak, jako fermenty proteolytické mikrobů štěpících bílkoviny nebo spíše ještě toxiny řady mikrobů pathogenních.

Princip s uvedenými vlastnostmi musí být secernován také v prostředí tekutém; zde pak jsou mnohem dokonalejší podmínky k jeho oddělení od mikroba, k zevrubnému qualitativnímu i quantitativnímu studiu jeho účinnosti, k poznání jeho resistance a snad i jeho biologické nebo chemické podstaty. Polycoccus pro tyto pokusy pěstován v obyčejném výživném bouillonu, připraveném podle běžné ústavní methody, který co do výživnosti téměř nekolísá. Za nádobky jsme volili buď široké, kulaté láhve, podobné oněm, na nichž se pěstuje difterie, nebo Erlenmayerovy baňky. Z pokusů o vzrůst polykoka jsme věděli, že je značně aerofilní (tak na př. již v tlustých vrstvách bouillonových bez jakéhokoliv jiného opatření, usnadňujícího anaerobiosu, roste velmi chabě), předpokládali jsme tedy — jak se později ukázalo, správně — že sekrece účinného principu bude tím větší, čím větší jest kontakt vzdušného kyslíku s kultivační půdou. Snažili jsme se proto, aby vrstva bouillonu nebyla v nádobách nikdy tlustší než $1\frac{1}{2}$ nebo 2 cm. Možnost oddělití účinnou látku rozpuštěnou v bouillonu od mikrobiálních těl byla v našem případě dvojí: filtrace porcelánovou nebo infusoriovou svíčkou a pak, dík zvláštnímu vzrůstu polykoka, odpipetováním povrchních vrstev bouillonu po skončené sedimentaci s následným prudkým centrifugováním ($\frac{1}{4}$ hodiny až 20 minut při 3000 obrátkách) a nové odpipetování povrchních vrstev. Filtrace se osvědčila v našich pokusech špatně. Na to jsme byli připraveni; experiment plně potvrdil, co jsme očekávali, že účinná látka zůstane z velké části adsorbována ve filtru, podobně jako mnohé jiné látky povahy kolloidní, či alespoň vázané na koloidy (fermenty) ztrácejí následkem adsorbce po průchodu filtrem část nebo většinu své působivosti. Proto experimentováno s filtrátem pouze na počátku, a to pro kontrolu. Všechny ostatní

pokusy provedeny s centrifugovaným dekantátem, jehož účinnost je mnohonásobně větší a také konstantnější. Účinný dekantát rozdělen do zkumavek téměř ve všech pokusech v množství 2 *ccm*. Mikroba, jenž byl vydán inhibičnímu a ev. lytickému působení antagonisty, bylo používáno ve všech pokusech v quantu velice malém, a pokud možno, stálém. Rutinou jsme dosáhli toho, že mikrobiálních jedinců, s nimiž konány pokusy v různých časových intervalech, bylo shledáno při počítání množství téměř stejné, takže jsme pracovali za shodných podmínek. Obvykle jsme postupovali tak, že seškrábnuta čerstvá kultura mikroba, s nímž experimentováno, okrajem vždy též platinové kličky a emulgována pečlivě ve 4 *ccm* bouillonu. Z této emulze přeneseny Pasteurovou pipetou 1 — 3 kapky do 2 *ccm* dekantátu z kultury polykoka. Jest ovšem pravda, že dekantát takto získaný tu a tam obsahoval jednotlivá individua polykoka, který se pak při založení experimentu poněkud pomnožil, takže by se mohlo namítnouti, že získaných výsledků nebylo dosaženo účinnosti principu, kterého bylo s bouillonovým dekantátem použito k pokusu, nýbrž onoho, který vznikl pomnožením polykoků již během pokusu. Exaktními pokusy jsme se přesvědčili, že tomu tak není. Jednak ve valné části případů dekantát polykoka vůbec neobsahoval a tam, kde několik jedinců vyrůstalo, neměli žádného vlivu již pro svůj nepatrný počet.; jasně to vysvítá na př. z pokusu, kde byl účinný princip postupně ředěn bouillonem. Obsahoval-li náhodou dekantát několik jedinců, byli rozděleni téměř stejnomořně do každého zředění a přes to, že se pomnožili ve všech rourkách stejně (všude v sotva dokazatelném množství), byl nejmenší účinek tam, kde původní účinný princip zředěn nejvíce.

Nedostatek místa nedovoluje, abychom podali exaktní popis pokusů, jež jsme prováděli s účinným principem polykoka, ač by v něm byl dosti zajímavý příspěvek k experimentům tohoto druhu. Snažili jsme se experimentovati co nejpřesněji na materiálu pokud možno nejširším s několikerým opakováním všech pokusů, zejména ovšem takových, jichž výsledek se nám zdál být kolísavý nebo problematický. Podáváme tedy stručný přehled všech výsledků s event. dedukcemi, které si troufáme činiti v jejich důsledku:

1. Zkoušena působnost dekantátu bouillonové kultury na různé mikroby, zejména pathogenní, při čemž účinný princip brán z kultur, počínaje od 24 hodin po naočkování polykoka do bouillonu den za dnem až do 14 dnů, dále za 21 den a po měsíci. Především bylo pozorovati, že již dekantát 24hodinné kultury polykoka v bouillonu jest vysoce účinný na mikroby chromogenní, jejichž růstu zabraňuje úplně po 48 hodin; po 72 hodinách počnou tyto dorůstati, ale zůstanou i po týdnu v dekantátu méně hojně nežli v bouillonové kontrole. Z pathogenních mikrobů působí nejsilněji na anthrax, který při našem experimentálním zařízení nevyrostl vůbec ani po týdenní inkubaci dekantátu. Tyfus zůstal sterilní prvních 24 hodin, později dorůstal, ale stále je slabší, než kontrola. Stafylokok

rovněž zde vůbec nevyrostl. Pyocyan a proteus rostou hned prvních 24 hodin, ale mnohem slaběji a zůstává mezi nimi a kontrolou rozdíl i po týden. Nejzajímavější je však případ streptokoku, který se nepatrně pomnožuje během prvních 4 dnů, od pátého dne ustupuje, až nakonec mizí úplně, jsa zřetelně rozpuštěn. Dekantáty z kultury polykoka staré 3 až 4 dny, jsou téměř stejně účinné a s nepravidelným kolísáním vydrží ve své účinnosti celých 14 dní. 21. den jest účinnost dekantátu slabší, po měsíci mizí úplně. Je povšimnutí hodno, že bouillonová kultura polykoka, k níž přidáno něco králičího sera, byla účinná i po měsíci. Současně konané pokusy s filtrátem kultury jevily podobný průběh, ale mnchem slabší účinnost. V pozdějších pokusech používáno pouze dvou druhů mikrobiálních, na něž byl účinek největší, a to anthraxu a stafylokoku.

2. Zkoušeno, zdali mikroby, vydané vlivu účinného principu, se mění ve své morfologii nebo biologii. U anthraxu v případech nejúčinnějších pozorovány zřetelné známky rozpouštění. U pyocyana někdy změna tvorby pigmentu. U tyfu a mikrobů příbuzných ani změny morfologické, ani ve zkvašování cukrů ani snížená schopnost býti agglutinován. U stafylokoků a streptokoků nekonstantně zmenšení virulence, eventuelně známky rozpouštění.

3. Vliv kyslíku vzdušného na účinnost principu (ale i vzniku polykoka) je naprosto zřejmý. Stačí kultivace v tlustší vrstvě bouillonu a v užší nádobě, aby byl effekt zmenšen na minimum.

4. Vliv temperatury. Účinný princip zahřívaný půl hodiny na 56° zůstává nezměněn. Zahřát na 75° půl hodiny účinkuje slabě, zahřát na tutéž teplotu 1 hodinu účinkuje sotva patrně a je téměř anulován temperaturou kolem 80°

5. Účinný princip zkoušen quantitativně; vybrán k tomu princip tak účinný, že udržoval kulturu naočkovanou anthraxem a staphylokokem alespoň po 48 hodin úplně sterilní. Ředěno bouillonem v poměru 1 : 1, 1 : 3 a 1 : 5. Ve většině mnohokráte opakovaných těchto pokusů zůstalo ředění 1 : 1 prvních 24 hodin sterilní, ve druhých 24 hodinách již ncpatrнě zarůstá. Ve zředění 1 : 3 jest sotva znatelný vznik již prvních 24 hodin, ale kontrole se blíží až 4. nebo 5. den. Ve zředění 1 : 5 vzniká zřetelně již první den, třetí den se blíží kontrole. V druhém pokuse přidáváno stoupající množství mikroba, anthraxu či staphylokoku, a to 2 — 3 kapky místo obvyklé jedné. Princip, který zabraňoval alespoň po 82 hodin úplně vzniku anthraxu po přidání 1 kapky emulze, zabraňoval po touž dobu jeho vzniku za přidání 3 kapek, takže je patrno, že quantum přidaných mikrobů není pro pokus tak rozhodující, jako jakost a zředění samého principu. V pozdějších pokusech používáno pravidelně oné stupnice zředění, neboť tak mnohem lépe a citlivěji lze vystihnouti nejrůznější vlivy buď stupňující nebo zmenšující účinnost.

6. Jedním z nejnázornějších pokusů je vliv koncentrace vodíkových iontů na účinnost principu. Jak shora uvedeno, vzniká dobře mezi pH 6,8

až 7,8. Při pH 6,3 roste slabě. Bouillony zastaveny přesně na uvedená pH, naočkován do nich polycoccus a dekantát zkoušen po 12, 24, 36, 60, 84, 108 a 132 hodinách na účinnost, při čemž použito 4 shora uvedených zředění (koncentrovaný, 1:1, 1:3 a 1:5). Nejméně účinným se ukázal bouillon o pH 6,3, účinnější byl s pH 6,8, qualitativně i quantitativně nejlepší o pH 7,1; nepatrнě míň účinný o pH 7,4 a konečně značně méně účinný o pH 7,8. Jest tedy optimum účinku kolem reakce neutrální. Při tom pozorován zvláštní zjev. Zbytek bouillonových kultur po 7denním pokusu přefiltrován a změřeno pH. Shledalo se, že během vzrůstu polykoka vzrostl počet hydroxylových iontů pokaždě stejně, takže pH se zmenšuje v každém pokusu přesně o $\frac{3}{10}$. Bouillon, který před naočkováním měl pH 6,3, má po pokuse 6,1, b. před pokusem 6,8 po pokuse 6,5, b. před pokusem 7,1 po pokuse 6,8, b. před pokusem 7,4 po pokuse 7,1, b. před pokusem 7,7 po pokuse 7,4.

Podle experimentů dosud uvedených nemáme oprávnění vyjádřiti se určitě o povaze účinného principu, ale experimentální úkazy nejvíce podporují hypothesu sekrečního produktu fermentativní povahy: Svědčila by pro to zejména relativní thermolabilita produktu a pak mocná schopnost polykoka zkvašovati cukry, glykosidy i škrob, podmíněná přítomností amylazy, polyaz a nejrůznějších hexosidaz, které jsme se ovšem nesnažili v čistém stavu isolovati. Pátráme-li v literatuře, co asi vyhovuje exaktní definici fermentu, najdeme údaje (zejména v kapitole fermentů bakterielních) velmi neurčité. Již sama všeobecná definice fermentů udaná Eulerem, že totiž za fermenty pokládáme látky rostlinného nebo zvířecího původu, neznámého složení, které nejdříve v organismu nebo nezávisle na něm urychlují chemické pochody, nevyjadřuje nic zvláště určitého, ani je-li doplněna poučkou, že k enzymům nemůžeme počítati látky, které jsou při nastavší reakci podle stehiometrických poměrů spotřebovány. Oppenheimer ve své práci o bakterielních fermentech tvrdí, že jsou svým charakterem bližší fermentům zvířecím nežli rostlinným. To je kriterion, které svou přílišnou všeobecností nepřináší příliš jasna do našeho pozorování. Neboť neznáme-li podle jeho souborné práce žádného bakteriálního fermentu, jenž by se svým účinkem podobal našemu preparátu, neznáme s naprostou jistotou ani podobně účinného fermentu zvířecího. Přes to však existuje látka, přítomná v nejrůznějších živočišných tkáních, jako ve vaječném bílku, v slzách, v hlenu, slinách, leukocytech a nejrůznějších orgánech, která, třeba vzdáleně a ne do všech podrobností, upomíná na účinný princip našeho mikrokoka. Jest to Flemingův lysozym.

Není sice ani zde doposud shody o tom, je-li lysozym fermentativní látkou či není, vždyť ve stavu nečistém se dá extrahovati na př. i dekokcí (Bordet); ovšem ve stavu pokud možno čistém nesnáší temperatury mnoho přes 70° C. Exaktními pokusy (Wolf, Fleming, Jermoljeva a Bujanovskaja) bylo dokázáno, že obsahuje velmi často různé enzymy proteolytické, zejména tryptazu a oxydoreduktazu. Se zvýšováním teploty

stoupá jeho účinnost, jak je tomu u fermentů. Jeho působení se vztahuje na bakterie saprofytické a velmi málo na pathogenní, z těchto ještě nejvíce na anthrax. Způsob jeho účinku je velmi zřetelný. Saprofyt, jsoucí v tekutém prostředí, v husté emulzi je rozpouštěn někdy beze stop i po přidání lysozymu v ohromných zředěních. To není jediný projev lysozymu. Podle Gohara a jiných účinkuje při zvláštním zařízení pokusu specificky inhibičně na vzrůst mikrobů. Podle téhož autora působí z řady zkoušených mikrobů nejvíce na zvláštního mikroba bacila lysodeiktika. Velmi promptně zabraňuje vzrůstu sarcin a jejich vyrostlé kultury mohutně rozpouští. Ze sporulujících mikrobů účinkuje pouze na vegetativní formu. Různé látky bílkovité (gelatina, krev) nezeslabují jeho účinek, rovněž ne různá antiseptika v nepatrнých koncentracích. Optimum účinku jest asi při 45°. Resistentní mikrobielní individua, která nepodlehla působení slabých dávek, stávají se resistentnější pro dávky silnější. Isolovati v naprostо čistém stavu se ho dosud s určitostí nepodařilo.

Z toho krátkého přehledu zřejmo, že účinný princip našeho mikroba a Flemingův lysozym mají některé vlastnosti společné nebo alespoň podobné. Lysozym, jak uvedeno, jest mnohými autory pokládán za látku podobnou fermentům. Snažili jsme se nasbírat veškeré experimentální důvody, abychom se mohli podobně vyjádřit o účinné látce z polykoka. Z pokusů dosud uvedených by svědčila pro fermentativní povahu, jak již upozorněno, relativní thermolabilita. Velmi přesvědčivé pro fermentativní účinek je optimum účinnosti kolem pH 7,2. Pozoruhodným faktem (viz fermenty v lysozymu) je přítomnost mohutně a všeobecně působících fermentů sacharolytických. Gradace účinku při zvýšených temperaturách (zejména kolem 45°) pozorována přímo nebyla, ale při mechanismu tchoto působení není divu, neboť maximum spěší v inhibici vzrůstu. K této pak dochází při temperaturách přes 40° u většiny mikrobů z důvodů čistě fyzikálních.

7. K vlastnostem fermentů patří, že svoji specifickou činnost rozvíjejí i za přítomnosti antiseptik. Zkoušen tedy v dalším postupu vliv těchto na účinnost produktu. Z popsанého způsobu, jaký je účinek produktu polykoka, patrno, že zkoušeti účinek antiseptik na látku, jež sama působí jako antiseptikum, je velmi nesnadno, neboť k hce by mchlo dojít k sumaci účinku místo k inhibici. Analgické pokusy Goharovy s lysozymem, které jsme opakovali, nepokládáme za průkazné a nejsou exaktní. Srovnávací řada pokusů s účinnou látkou polykoka vynesla jediný konkrétní poznatek, že totiž slabé koncentrace fenolu skutečně nebrání ani inhibičnímu ani lytickému účinku. Zato mohutně působící preparát Carvasept z řady thymolové (thymol, jak známo, jest silný fermentový jed) účinnost, jak se zdá, snižuje.

8. Proti proteolytickým fermentům vytváří organismus protilátky, které tlumí jejich účinek. Proti bakterielním proteazám byly pozorovány tyto brzdicí látky v seru krevním po prvé Dungernem a po něm Hatou,

ale ani pozdější práce nepřinesly jasno v této věci. Podle méněně nejnovějších se zdá, že tyto inhibiční látky, namířené proti bakteriálním proteazám, nejsou vůbec pravými antifermennty, nýbrž že jde nejspíše o protilátky vyvolané kolloidním nosičem fermentu, s nímž také skutečně reagují a zbavují ferment vehikula, takže jeho účinnost přestává. Snažili jsme se vstřikováním účinného dekantátu králíkovi vyvolati tvorbu popsaných antilátek. Vstřikovali jsme subkutánně po celý měsíc, počínaje dávkami 2 ccm až maxim. 6 ccm pro dosi; pokus vykonán tak, že serum immunisovaného králíka přidáváno v rozličném zředění k účinnému principu, ostatní průběh pokusu zachován stejný jako jinde. Kontrolou bylo čerstvé serum zdravého králíka a morčete. Řadou exaktních pokusů dokázán zajímavý fakt, že každé čerstvé serum snižuje účinnost principu až do zředění asi 1 na 800. Ve zředění 1 : 1000 normální sera přestávají účinkovat, kdežto serum králíka immunisovaného v této koncentraci a ještě vyšší (1 : 5000) neutralisovalo dosti zřetelně inhibiční i lytický vliv účinného principu polykoka. O podstatě těchto látek zábranných, jsoucích již v normálním seru a ve vyšším titru v seru zvířete immunisovaného, nelze vysloviti nic určitého. Věc nabývá ještě více váhy, přirovnáme-li, že nativní bílkoviny, tedy i serum (ovšem inaktivované), jsouce přidány ke kultuře polykoka, naopak potencují účinnost jeho charakteristického produktu. Celkem však se zdá, že tento pokus by podporoval naše předpoklady o příbuznosti principu s fermenty.

9. Důležitým charakteristikem fermentů jest, že fungují jako katalyzatory, t. j. urychlují reakci, nejsouce spotřebovány. Bylo tedy dalším úkolem zjistiti, jak se chová po té stránce účinný princip polykoka. Za tím cílem značně účinný dekantát naočkován jako obvykle anthraxem, po několika dnech, když vzrůst nebylo pozorovat, odcentrifugován a odpipetovaný vršek naočkován stafylokokem. V další řadě pokusů k vysycování použito stafylokoku, k titraci anthraxu. V obou případech se zdálo, že quantum účinné látky bylo naočkováním prvého mikroba zmenšeno. Zdálo by se tedy, že účinný princip nechová se v tomto směru jako většina typických enzymů. Jestliže však prostudujeme věc podrobně, shledáme, že tu existuje ještě jiná možnost, která experimentu dodává zdání, jakoby se látka skutečně na reakci spotřebovala. Jest to možnost adsorbce. Viděli jsme již, že při prosté filtrace kaolinovou svíčkou jest velká část účinné látky adsorbována za filtračního procesu. Je na snadě myšlenka, zda snad i zde první dávka mikrobů, které bylo ve vzrůstu zabráněno, nepůsobí jako mohutné adsorbens, které by odnášelo na svém povrchu přichycený účinný princip. Máme dojem, že se nám to podařilo dokázat v dalších pokusech, v nichž byla k účinnému dekantátu přidána hustá emulze mikrobů živých i mrtvých; po určité době kontaktu odcentrifugováno a zbylá tekutina zkoušena na účinnost. Ve všech případech se ukázalo, že účinný princip z dekantátu zmizel, ač na př. u mikrobů mrtvých nemohl býti spotřebován na zabránění vzrůstu. Činíme tedy závěr, že polycoccus

secernuje účinný princip, jenž jest vázán na komplexní kolloidy, které snad působením svého vysokého náboje elektrického jsou snadno adsorbovatelné.

10. *Polycoccus* není isoantagonistou za normálních poměrů.

11. Podle názoru starších autorů rozdělují se fermenty bakteriální na dvě veliké skupiny: v t. zv. exofermenty, t. j. produkty vylučované bakteriální buňkou, jejichž nejrůznější účinek podle specifického charakteru je patrný i v okolí; a druhou skupinu, blíže neznámou, t. zv. endoenzymů, jež řídí intracelulární formativní a vývojové pochody. Mezi oběma druhy, dříve tak přísně oddělovanými, není však principiální rozdílu a přechod jest zcela plynulý (Oppenheimer). Dnešní názor předpokládá, že každá bakteriální buňka skutečně obsahuje všechny fermenty, jichž je jí nezbytně zapotřebí k životním procesům, ale ne vždycky v takovém množství, aby přecházely do okolního prostředí. V mnoha případech pak byly různými fysikálními nebo chemickými pochody t. zv. endoenzymy isolovány i z mikrobů, které nikdy neměly zevně žádné charakteristické fermentativní schopnosti. Tak mechanickým rozetřením byla získána Stewensem u streptokoků peptidaza, sacharaza a lipaza. Jiní autoři používají spontánní desintegrace bakteriálního protoplasmatu během antolysy k isolaci fermentů, jichž přítomnost na první pohled nebyla vůbec cíekávána. Jiná metoda je střídavé zmrazování a konečně podle Averyho a Culena macerace mikrobů žlučovými solemi. Posledně uvedenými metodami podařilo se anglickým autorům isolovati na př. i z pneumokoka proteazy. Ačkoliv účinný princip polykoka je exogenní, a jde-li snad o ferment, jest to exoferment, snažili jsme se přece desintegrací protoplasmatu polykoka zvýšiti quantum účinné látky, ev. prokázati jiné typické fermenty. Používali jsme dvou právě uvedených metod zmrazovací a metody rozpuštění bakteriálního protoplasmatu účinkem žluči. U žádného z obou případů se nám nepodařila isolace jiných fermentů, snad že naše technika nebyla ještě dostatečně jemná. Typický princip inhibiční a lytický však nejen nebyl procesem zeslaben, nýbrž skutečně se zdál přibírat na účinnosti.

12. Další velká řada pokusů zabývala se problémem o účinku principu na pathogenní mikroby aplikované *in vivo*. Při tom zkoušen jednak therapeutický účinek na vyvinuté již affekce mikrobiální, za druhé účinek inhibiční při aplikaci pathogenního mikroba na jedné straně těla a dekantátu kultury polykoka na druhé. Abychom zůstali přesně exaktní, jsme nuceni konstatovati, že v pokusech toho druhu nepozorovali jsme žádného takového účinku, který by se snad nedal vyložiti přirozenými hojivými i ochrannými schopnostmi organismu. Jinak je tomu s bakteriálními kulturami, které zůstaly delší dobu s účinným principem v kontaktu a kterým bylo při dlouhodobé inkubaci zabráněno v pomnožení a vzrůstu. Jak již řečeno, účinek exkretu polykoka je dvojí, inhibiční a lytický. Druhý byl sice často méně markantní, ale v některých případech naprosto nesporný. Tak u streptokoka popsaného sub 1. nastávalo

nejprve zřetelné pomnožení a pak úplné vyjasnění, ani kultivačně ani mikroskopicky nebyly v tomto případě streptokoky dokázány. Nejmarkantnější však bylo rozpouštění bacila anthraxu. Tam, kde bacil jednou prolamil bariéru inhibičního působení účinného principu, nezabránilo již nic dalšímu jeho množení, ač byly pozorovány různé známky degenerace. Jinak tomu je tam, kde anthrax vůbec nevycrstl. Naše kultura anthraxu je velmi pathogenní pro morče. Dávka, které používáme v pokusech, vstřiknuta se dvěma *ccm* účinného principu buď ihned či několik hodin po naočkování zabíjela s určitostí morče třetí, nejvýše čtvrtý den. Jiné 2 *ccm* inkubovaného dekantátu s anthraxem, kterému zabránil ve vzrůstu, po 12 hodinách nejdříve, pravidelně však po 4,- 5- i 8denním kontaktu nechávaly morče na živu, ač někdy zřetelně prodělávalo mitigovanou infekci. Dekantáty s anthraxem, zůstavší sterilní déle než 10 dní a vstřiknuté morčatům, nezpůsobily vůbec žádné reakce. Z toho soudíme právem, že bacilum anthraxu nejen bylo zabráněno ve vzrůstu, nýbrž že byly i rozpuštěny. Potvrdil to ostatně i pokus, v němž sledován celý proces tím, že z dekantátu polykoka naočkovaného anthraxem, který zůstával podle aspektu sterilní, naočkována vždy kapka do tekutého agaru, jenž vylit na plótnu. Ze začátku se tak dělo po několika hodinách, později po několika dnech. Po prvé hodině vzrostly kolonie anthraxu v takovém quantu, v jakém byly přidány k dekantátu. Po několika hodinách bylo znáti lehké pomnožení bacila anthraxu, které dostoupilo maxima v době kolísající podle pokusu mezi 6. až 18. hodinou. Pak nástával zřetelný úbytek kolonií, až nakonec byly plotny zcela sterilní.

13. Ve velké řadě konány za nejrůznějšího experimentálního zařízení přímé porovnávací pokusy s vaječným lysozymem. Přípravu a podrobnosti tohoto experimentálního zařízení pomíjíme, uvádíme jen konečné výsledky. Jsou asi takové: Inhibiční působení na vzrůst mikrobů jest mnohem lepší u dekantátu kultury polykoka, než u lysozymu na všech mikrobech pathogenních, zejména anthraxu, stafylokokách a tyfu; asi stejně jsou u pyocytana a lepší u lysozymu v případě *prodigiosa Indica rubra* a *putida*. Nesrovnatelně účinnější jest působení lysozymu na sarcinu vzdušnou. Lytické působení lysozymu na vzrostlé bouillonové kultury je u všech saprofytů markantnější, nežli za použití dekantátu polykoka. V případě streptokoka a stafylokoků, pokud jsme účinek mohli opticky měřit, účinkuje náš princip lépe nežli lysozym.

14. Poslední a snad nejpracnější řada pokusů byla věnována isolaci nebo alespoň koncentraci účinné substance z bouillonových kultur polykoka. Tyto pokusy nepokládáme za dokončené, zmíníme se tedy o nich pouze stručně. Vedeni myšlenkou na fermentativní původ účinné látky, použili jsme všech běžných prostředků, udaných Eulerem i jinými autory, pro isolaci fermentů ze tkání i roztoků. Srážení acetonem zůstalo bez účinku. Srážení alkoholem rovněž nemělo zřejmého efektu. Další naší snahou bylo vysoliti účinný princip ammoniumsulfátem. Na některých

pokusech se jevilo, že účinný princip (pravděpodobně adsorbován na vysolenou bílkovinu) mohl být převeden do jiného bouillonu, kde zřetelně účinkoval. Velmi úspěšný byl adsorbční pokus se spodium, které dokázalo na sebe strhnouti skutečně maximum účinné látky, jež s tímto vehikulem mohla být rovněž, a to v koncentrovanějším stavu, přenesena do obyčejného bouillonu. Koncentrace na práškovitý aluminiumhydroxyd neměla celkem úspěchu. Zato plného dosaženo methodou udanou Lehmannem a Neumannem pro isolaci exotoxinů z bouillonových kultur. K bouillonovému dekantátu polykoka přidán nasycený roztok zinkchloridu, na vytvořenou sraženinu působeno směsí ammoniumsulfatu a ammoniumcarbonatu, načež zbylá tekutina odpipetována a vysrážena ammoniumsulfatem. Sraženina proprána a rozpuštěna v bouillonu. Takto koncentrovaný princip připravený asi z 20 ccm obyčejného dekantátu dokázal zabrániti vzrůstu anthraxu v quantu 1 kapky, přidané jako ve všech pokusech ke 2 ccm obyčejného bouillonu. —

Uzavíráme řadu pokusů vykonaných jak s polykokem samotným, tak s jeho účinnou látkou, ať ve stavu nativním nebo koncentrovaném. Nejsme s to, abychom na základě pokusů dosavadních, podle možnosti mnohostranných, vyslovili určité rozhodnutí, jde-li o ferment či nikoliv. Mnoho fakt se zdá skutečně svědčiti pro to, že látka nebo snad směs látek má vlastnosti příbuzné fermentům. Alespoň tolik je jistó, že svým účinkem upomíná, třeba ne ve všech bodech a quantitativně rozdílně, spíše na Flemingův lysozym, nežli na př. na produkty bacila pyocyanea. Zevrubným popisem biologických vlastností polykoka Honli stal se pokus podati nový příspěvek otázce mikrobiálního antagonismu. Bude naší snahou, abychom v dalších pracích, které ostatně již zahájeny, dokázali, může-li míti dosavadní teoretické experimentování praktické důsledky na nemocném člověku.

R e s u m é.

V úvodu předesíláme přehled různých projevů antagonistních mezi mikroby vůbec.

Podařilo se nám pozorovati zajímavé projevy antagonistní na mikrokoku dosud nepopsaném, jejž jsme nazvali *polycoccus Honli*.

Tento *polycoccus* vydává do okolí (do bouillonu, do agaru) produkt, jenž působí jednak inhibičně, jednak lyticky na celou řadu mikrobů (*staphylococcus pyogenes aureus*, *streptococcus haemolyticus*, *bac. anthracis*, *b. typhi*, barevné mikroby: *bac. prodigiosus*, *Indicus ruber*, *bact. putidum*).

Optimum tvorby této látky je při pH 7,2, meze tvorby pH 6,8—7,8, meze temperatury 16 — 56° C, při vyšší teplotě účinnosti ubývá.

Polykok potřebuje k růstu a zvláště k tvorbě produktu nutně vzdušného kyslíku.

Účinný produkt má některé vlastnosti podobné s Flemingovým lysozymem: oba mají 2 složky, inhibiční a lytickou, jenže u lysozymu je význačnější složka lytická. Dále se liší mikroby, na něž působí: lysozym účinkuje na saprofyty (b. lysodeicticus, sarcina), slabě účinkuje na mikroby sporulující; produkt polykoka účinkuje stejně, ne-li víc, i na mikroby pathogenní.

Normální serum (králičí, morčí) do vysokého ředění zeslabuje účinky produktu.

Lyticke fasi účinku předchází reaktivní pomnožení mikroba vy- staveného účinku produktu. Záleží na účinnosti produktu, dojde-li potom k rozpuštění nebo naopak k dalšímu pomnožení onoho mikroba.

Produkt v mnohých bodech odpovídá požadavkům kladeným defini- cí na fermenty: je relativně thermolabilní ; je resistentní vůči desinficiencím vyjímaje řadu thymolovou (t. zv. desinficience fermentová); mohutně se adsorbuje na př. na spodium, kaolin ; podařilo se nám u králíka immu- nisací vytvořiti t. zv. antifermensty. Názor o fermentativní povaze produktu je tím lákavější, ježto polykok tvoří i fermenty mohutně sacharolytické.

Produkt se silně adsorbuje na mikroby, i usmrcené.

Dosaženo toho, že účinný produkt různými methodami (srážením bílkovin amoniumsulfatem, adsorbcí na spodium, methodou na vysrážení exotoxinů $ZUCl_2$) zachycen a koncentrovaný přenesen.

LITERATURA.

- Perdrix: Sur la transformation des matières azotées dans les cultures de la bactéridie charbonneuse. Annales de l'Institut Pasteur 1888, p. 354.
- Honl a B u k o v s k ý: Léčení vředů běrcových proteidy bakterielními. Rozpravy České akademie II. tř., Praha 1899.
- Emmerich und Löw: Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. Zeitschrift für Hygiene 1899, B. 31, S. 1.
- Honl: Über Bacteriotherapie der Schenkelgeschwüre. — Wiener klinische Rundschau 1900 (Separat).
- Lode: Experimentelle Untersuchungen über Bakterienantagonismus. — Zentralblatt für Bakteriologie, Originale, 1903, 33, 196.
- Bennecke: Bau und Leben der Bakterien. — Leipzig und Berlin 1912.
- Kolle-Hetsch: Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten. — Berlin-Wien, 1919⁵, I. B. 555.
- Gratia: De l'action lytique des staphylocoques vivants sur les staphylocoques tués. — Comptes rendus de la Société biologique 1924, 640.
- Gratia et Dath: Propriétés bactériolytiques de certaines moisissures. — Comptes rendus de la Société biologique 1925, 1442.
- Gratia et Dath: Moisissures et microbes bactériophages. — Comptes rendus de la Société biologique 1925, 461.
- Schiller: Über erzwungene Antagonisten. — IV., V., VI. Mitteilung. Zentralblatt für Bakteriologie, Originale, 1925, 96, 57; 1927, 103, 304; 1930, 118, 163.
- Euler: Chemie der Enzyme. Teil I, II. — München 1925.
- Calmette: Manuel technique de microbiologie et sérologie. — Paris 1926.
- Nicolle-Boquet: Eléments de microbiologie générale. — Paris 1926.
- Gotschlich: Allgemeine Biologie und Morphologie der pathogenen Mikroorganismen. V díle Kolle-Kraus-Uhlenhuth: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. I, 1927.
- Lode: Bacillus pyocyaneus. Tamtéž VI, 1927.
- Bordet (Margueritte): Contribution a l'étude du lysozyme. Comptes rendus de la Société biologique 1928, 1252.
- Bordet (Margueritte): Essais de l'extraction du lysozyme. Tamtéž 1928, 1255.
- Oppenheim: Bakterienenzyme. — Kolle-Kraus-Uhlenhuth: Bd II, 1929.
- Gohar M. A.: On lysozyme. — Zentralblatt für Bakteriologie, Originale, 1930, 119, 240.
- Poppe-Busch: Fermentstudien am Virus der Maul- und Klauenseuche. Zentralblatt für Bakteriologie, Originale, 1931, 119, 398.
- Jermoljeva und Bujanovskaja: Über die Natur des Lysozums. Zentralblatt für Bakteriologie, Originale, 1931, 122, 267.