

POUŽITÍ OSCILOGRAFICKÉ POLAROGRAFIE V MIKROBIOLOGII

DUŠAN KALÁB

Výzkumné pracoviště, n. p., Bioveta, Ivanovice na Hané

Oscilografické polarografie lze použít k sledování aktivity některých bakteriálních enzymů a k sledování změn v chemickém složení živných půd obsahujících aminokyseliny, nukleové sloučeniny apod.

Celá řada látek významných pro výživu a metabolismus mikrobu je oscilopolarograficky aktivní. Jde zejména o různé cukry, aminokyseliny, peptidy a bílkoviny, jejichž oscilopolarografické chování studovali M. Heyrovský, R. Pleticha, D. Kaláb, F. Franěk, Z. Pechan, E. Paleček, F. Šantavý, V. Kalous, P. Valenta, Z. Kadaňka a L. Minářová [1—12], dále některé steroidy, jejichž oscilografickou polarografií se zabývali L. Molnár, J. Nosek, M. Ledvina a V. Morávek se spolupracovníky [13—17], vitaminy, některé růstové faktory, antibiotika a konečně též nukleové kyseliny a jejich složky. Oscilografickou polarografií těchto látek se zabývali K. Černý, R. Pleticha, K. Wiesner, J. Heyrovský, H. Berg a E. Paleček [18—24]. Mikrobiologické aplikace klasické polarografie shrnuje monografie M. Březiny a P. Zumana [25]. Oscilopolarografickým sledováním kyslíku v suspensích kvasinek se zabýval Kalaidijev se spolupracovníky [26]. V naší práci uvedeme některé možnosti využití oscilografické polarografie střídavým proudem při studiu problémů výživy a metabolismu mikrobu.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Pracovali sme s Polaroskopem P 524, se rtuťovou kapkovou elektrodou. Doba kapky 3,1 s, délka kapiláry 12 cm. Analysovali jsme v nádobkách podle J. Heyrovského. Oscilogramy jsme fotografovali Exaktou Varex s Biotarem 1 : 2, na kinofilm Foma 21/10 DIN expozicemi 0,5 s.

Bakteriální kměny, živné půdy a kultivační technika

Pokusy jsme konali na dvou kmenech hemolytického *Escherichia coli*. Základem použitých plně syntetických živných půd byl 0,66 M fosfátový tlumivý fyziologický roztok o pH 7,7—8,3. Aminokyseliny byly přidávány v množství 0,2 %, glukosa 0,1 % a složky nukleových kyselin v koncentraci 0,01 %. V těchto půdách jsme sledovali růst kultur *Escherichia coli* vysévaných ze šikmého agaru i vliv 1 %-ních promytých suspensí klidových buněk *Escherichia coli* na použitý substrát. Kultivace probíhaly při 37 °C ve zkumavkách s 10 ml půdy. Chemikálie použité k přípravě půd měly analytickou čistotu, aminokyseliny byly chromatograficky čisté a složky nukleových kyselin byly preparáty California Foundation for Biochemical Research, CfP. Oscilopolarografické analýsy byly kontrolovány souběžně prováděnou papírovou chromatografií.

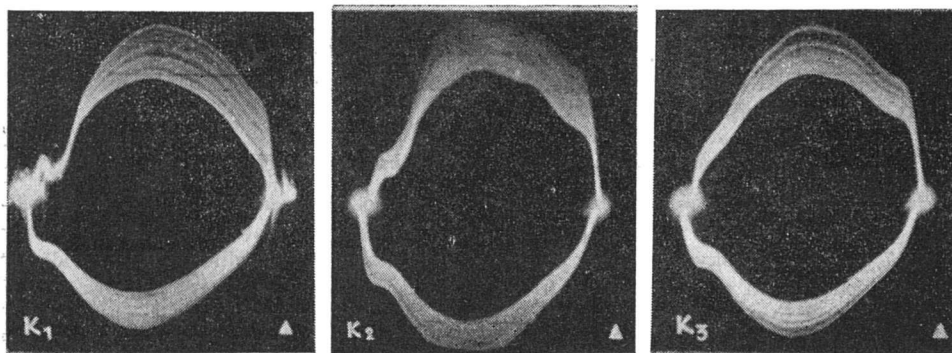
Výsledky

Sledované aminokyseliny, složky nukleových kyselin a nevhodnější základní elektrolyty pro jejich oscilopolarografickou analýsu shrnuje tab. 1.

Tabulka 1

Substrát	Základní elektrolyty		
	NaOH	H ₂ SO ₄	HCOOH : HCOONH ₄
<i>l</i> -asparagin <i>l</i> -kyselina glutamová <i>l</i> -tryptofan	+		
adenin hypoxanthin guanin xanthin thymin	+	+	+
adenosin guanosin		+	+
kyselina adenylová (směs 2' a 3' fosfátu) guanylát sodný (3xNa · 4 H ₂ O)		+	+

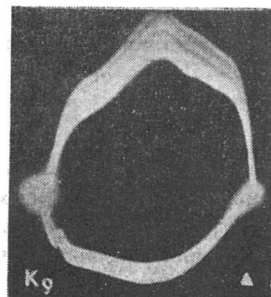
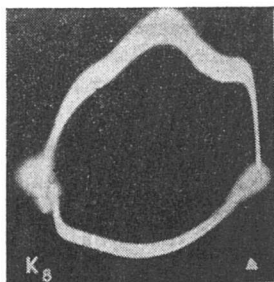
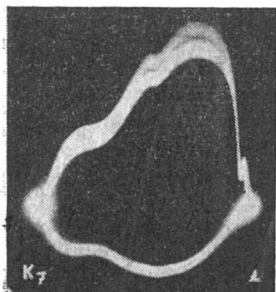
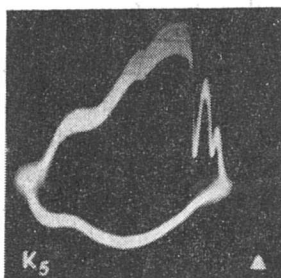
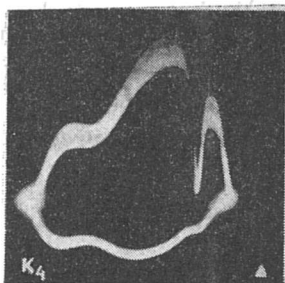
Nejprve jsme sledovali vliv promyté suspence klidových buněk *Escherichia coli* na některé aminokyseliny. Vzorčky k analýsám jsme odebírali po jedné a pěti hodinách inkubace. Do polarografické nádoby jsme pipetovali vždy 1,6 ml bakteriální suspence a 0,4 ml 1 M-NaOH. Fotožrafovali jsme při 0,2 mA, stejnosměrné složce napětí 2 a citlivosti 4. Zatím co na oscilogramu vzorku umrtvené suspence buněk *Escherichia coli*



Oscilogram 1. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ asparaginu v 1 M-NaOH. Oscilogram 2. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ asparaginu v 1 M-NaOH po 1 hodině inkubace s *Escherichia coli*. Oscilogram 3. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ asparaginu po jeho vymizení po 5 hodinách inkubace s *Escherichia coli*.

zůstal katodický zářez asparaginu vzhledem k její zastavené enzymatické činnosti beze změny (oscilogram 1), pozorujeme na oscilogramu živé suspence klidových buněk *Escherichia coli* již po jedné hodině inkubace se substrátem zřetelné zmenšení katodického zářezu asparaginu (oscilogram 2). V páté hodině inkubace katodický zářez asparaginu zcela vymizel (oscilogram 3). Popsané výsledky potvrzuje papírová chromatografie. Stejně výsledky jsme získali oscilopolarografickou analýsou kultury *Escherichia coli* rostoucí volně po 24 hodin v téže půdě s 0,1 % glukózy. Oscilopolarografická metoda je v obou případech vhodná k rychlému sledování činnosti bakteriální asparaginasy. Obdobně lze sledovat též využití dalších oscilopolarograficky aktivních aminokyselin.

Zvláštní pozornost jsme věnovali oscilopolarografické analýze některých složek nukleových kyselin, přidávaných do bakteriologických živných půd jako specifické růstové faktory řady mikrobů. Během 24 hodin růstu kultur *Escherichia coli* na použité syntetické živné půdě můžeme oscilopolarograficky sledovat například vznik hypoxanthinu z adeninu (oscilogram 4 a 5), adenosinu (oscilogram 6 a 7) a kyseliny adenylové, nebo využití guaninu, guanosinu (oscilogram 8 a 9) a guanylátu, probíhající pod vlivem bakteriálních nukleových desaminas [27]. K oscilopolarografické analýze jsme pipetovali vždy po 1,6 ml bakteriální kultury a 0,2 ml 1 M-H₂SO₄, nebo 2,2 ml mravenčanového pufru podle E. Palečka [23, 24]. Oscilogramy jsme fotografovali při 0,3 mA, stejnosměrné složce 4 - 5 a citlivosti 4. Oscilopolarograficky můžeme dobře sledovat rozdílnou rychlost



Oscilogram 4. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ adeninu v 1 M-H₂SO₄. Oscilogram 5. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ adeninu a hypoxanthinu v 1 M-H₂SO₄.

Oscilogram 6. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ adenosinu v 1 M-H₂SO₄.

Oscilogram 7. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ hypoxanthinu z adenosinu v 1 M-H₂SO₄. Oscilogram 8. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ guanosinu v mravenčanovém pufru. Oscilogram 9. Oscilopolarografická křivka $dE/dt = f_1(E)$ xanthinu z guanosinu v mravenčanovém pufru.

využití a přeměny volných purinových bází, jejich nukleosidů a nukleotidů. Tak například volný adenin nepřešel ani po 22 hodinách růstu kultury *Escherichia coli* zcela v hypoxanthin (oscilogram 4 a 5), zatím co nukleosid adenosin (oscilogram 6 a 7) přešel v hypoxanthin úplně již po 9 hodinách růstu. V téže době jsme pozorovali též úplnou přeměnu nukleosidu guanosinu v xanthin (oscilogram 8 a 9). Rychlosti a cesty využití a přeměny ostatních složek nukleových kyselin v kulturách *Escherichia coli* jsou předmětem našeho výzkumu.

Diskuse

Z uvedených výsledků plynou četné možnosti praktického využití oscilografické polarografie v mikrobiologii. Jde především o značnou rychlost analýsy, malou spotřebu vzorku a experimentální nenáročnost metody. Aplikace v oboru enzymologie mikrobů, kvalitativní i kvantitativní orientace v procesech výživy a metabolismu bakterií poskytuje výhled na analytické sledování průběhu hloubkové nebo průtokové kultivace v technické mikrobiologii. Možností analytického stanovení řady složek nukleových kyselin předčí oscilografická polarografie nejen klasickou polarografií, ale znamená pro mikrobiologii též podstatné experimentální zjednodušení a urychlení analýsy proti běžně používaným spektrofotometrickým metodám, nebo časově náročnější chromatografii. Lze proto předpokládat mikrobiologické využití oscilografické polarografie k řešení některých speciálních problémů biofyzikálního a genetického rázu. Využití oscilografické polarografie v tomto směru bude předmětem našich dalších prací.

ПРИМЕНЕНИЕ ОСЦИЛЛОГРАФИЧЕСКОЙ ПОЛЯРОГРАФИИ В МИКРОБИОЛОГИИ

ДУШАН КАЛАБ

Биовета, нац. пр., Исследовательское отделение, Ивановице на Гане

Выводы

В работе описаны некоторые аналитические возможности применения осциллографической полярографии переменным током при изучении утилизации и метаболизма аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований и их нуклеозидов и нуклеотидов в культурах бактерии *Escherichia coli*.

Осциллополярографический анализ был проведен с помощью аппарата Поляроскоп Р524, Кржижик — Прага, с ртутным капельным электродом, дающим кривые зависимости $dE/dt = f_1(E)$. Отмечена возможность осциллополярографического исследования активности некоторых бактериальных энзимов и использования осциллографической полярографии к быстрому качественному и количественному контролю изменений химического состава синтетических питательных сред при глубинной или непрерывной культивации микробов. В заключение предложены некоторые возможности применения осциллографической полярографии в разных отраслях микробиологического исследования.

ANWENDUNG DER OSZILLOGRAPHISCHEN POLAROGRAPHIE IN DER MIKROBIOLOGIE

DUŠAN KALÁB

„Bioveta“, Nationalunternehmen, Forschungsabteilung, Ivanovice in Haná.

Zusammenfassung

Es werden einige analytische Anwendungen der oszillographischen Polarographie beim Studium der Utilisation und Metabolismus der Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen sowie deren Nucleosiden und Nucleotiden in den Kulturen der *Escherichia coli* erwähnt.

Es wurde mit der Quecksilbertropfelektrode und dem Polaroskop P 524 gearbeitet. Auf die Möglichkeit der Verfolgung der Aktivität einiger bakteriellen Enzyme wird gezeigt. Eine schnelle qualitative und quantitative Kontrolle der Änderungen in der chemischen Zusammensetzung der synthetischen Nährboden bei submerser oder kontinuierlicher Kultivierung der Mikrobe wurde vorgeschlagen. Anschliessend werden einige Möglichkeiten der Anwendung der oszillographischen Polarographie in verschiedenen Richtungen der mikrobiologischen Forschung erwähnt.

APPLICATION OF OSCILLOGRAPHIC POLAROGRAPHY IN MICROBIOLOGY

DUŠAN KALÁB

Research Department, Bioveta, n. p., Ivanovice

Summary

The paper deals with some analytical possibilities of application of oscillographic polarography using a. c. current in study of utilization and metabolism of amino acids, purine and pyrimidine bases as well as of their nucleosides and nucleotides in cultures of bacteria *Escherichia coli*.

The oscillographic analyses were carried out by means of the instrument Polaroscope P 524, Křižík — Praha, performing curves of the dependence $dE/dt = f_1(E)$. The mercury dropping electrode was used. Attention is drawn to the possibility of oscillographic following the activity of some bacterial enzymes and to the application of this method to rapid qualitative and quantitative analytical control of changes in chemical composition of synthetic nutritive media in submersion or continual cultivation of microbes. Some possibilities of application of oscillographic polarography in various branches of the microbiological research are proposed.

LITERATURA

1. Heyrovský M., *Diplomová práce*, Karlova universita, Praha 1957. — 2. Pleticha R., *Chem. listy* 45, 185 (1951). — 3. Kaláb D., Franěk F., *Pharmazie* 10, 31 (1955). — 4. Kaláb D., *Pharmazie* 10, 528 (1955). — 5. Pechan Z., Kaláb D., Paleček E., *Pharmazie* 10, 526 (1955). — 6. Šantavý F. a spol., *Chem. listy* 49, 834 (1955). — 7. Kaláb D., *Pharmazie* 11, 526 (1956). — 8. Kaláb D., *Diplomová práce*, Masarykova universita, Brno 1955. — 9. Kalous V., Valenta P., *Chem. listy* 50, 1654 (1956). —

10. Kaláb D., Spisy Přírodovědecké fakulty Masarykovy university, Brno, No. 387, 1 (1957).

11. Kaláb D., Naturwiss. 44, 350 (1957). — 12. Kadaňka Z., Minářová L., *Diplomová práce*, Masarykova universita, Brno 1957. — 13. Molnár L., Chem. zvesti 10, 911 (1954). — 14. Nosek J., Ledvina M., *Sborník prací VLA*, Praha 1956, 97. — 15. Morávek V. a spol., Publ. Fac. Sci. Univ. Mas., Brno, No. 387, 401 (1957). — 16. Morávek V., ibid. No. 398, 389 (1958). — 17. Morávek V., Naturwiss. 45, 571 (1958). — 18. Černý K., Přednáška na zasedání Čs. společnosti chemické, Praha 1954. — 19. Pleticha R., Pharm. Zentr. 92, 395 (1953). — 20. Wiesner K., Chem. listy 38, 91 (1944).

21. Heyrovský J., Kalvoda R., *Oszillographische Polarographie mit Wechselstrom*, Berlin 1960. — 22. Berg H., Biochem. Z. 329, 274 (1957). — 23. Paleček E., Z. anal. Chem. 162/1, 1 (1958). — 24. Paleček E., Naturwiss. 45, 186 (1958). — 25. Březina M., Zuman P., *Polarografie v lékařství, biochemii a farmaci*, Praha 1952. — 26. Kalaidjiev A. a spol., Compt. rend. Acad. sci. (Bulgare) 9, 63 (1956). — 27. Lutwak-Mann C., Biochem. J. 30, 1405 (1936).

Adresa autora:

Prom. chemik Dušan Kaláb, Výzkumné pracoviště, n. p., Bioveta, Ivanovice na Hané.