

ky kakaa prosycené tukem a tedy hydrofobní. Jedná se proto o úkol velmi komplexní, který si vyžádá dosti značného úsilí ke zdárnému vyřešení, vedoucímu k velkému zvýšení jakosti výrobků našich závodů a k prodloužení jejich trvanlivosti.

#### L i t e r a t u r a

1. T. P. Hilditch: The Chemical Constitution of Natural Fats 2. vyd. 1947 str. 194.
2. ibid. str. 263.
3. S. V. Vaeck, Rev. int. de la Choc. 6, 100 (1951).
4. Straub a Malotaux. Rec. trav. chim. Pays-Bas 52, 275 (1933).  
A. W. Ralston: Fatty acids and their derivatives, 1948 str. 333.

## Metódy pre stanovenie aglutinačnej schopnosti technických mikroorganizmov\*)

ANNA KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ

Jednou z veľmi dôležitých vlastností technických mikroorganizmov, napr. kvasiniek pri alkoholickom kvasení, je spôsob ich sedimentácie. Miera sedimentácie je udávaná aglutinačnou schopnosťou. Aglutináciou sa tu rozumie shlukovanie kvasiniek vo viacbunecné vločky, ktoré tak nadobudnú väčšiu váhu a ľahšie padajú ku dnu kvasnej nádoby. Aglutinácia je preto z najväčšej časti príčinou sedimentácie. Pretože výsledný metabolizmus je závislý od veľkosti celkovej semipermeabilnej plochy, spôsob aglutinácie vplyva na priebeh metabolizmu kultúry. Pretože téma, o ktorej budem hovoriť, je v úzkej súvislosti práve s touto fyziologickou funkciou mikroorganizmov, rozoberiem najskôr príčiny aglutinácie.

*Malkov* (1) pokladá za príčiny aglutinácie napr. oslabenú enzymatickú aktivitu, oslabené rozmnožovanie, vplyv solí obsiahnutých v prostredí, zvyšujúcich alebo snižujúcich pH, účinok produktov výmeny látkovej, vplyv mliečnych baktérií a pod. Etanol ako produkt alkoholického kvasenia podporuje podľa *Plevaka* a *Bakušinskej* (2) veľmi silne aglutináciu, keď je prítomný v koncentrácii 1 — 3%, v koncentrácii 4 — 7% len slabo, v koncentrácii 8% už vôbec nie. Pri pivovarskom procese by mal vplyv na aglutináciu vo väčšej miere len alkohol pri stupňovitosti, ktorá ráta s extraktom až do 10% váhových. Avšak nie len metabolické produkty kvasiniek majú vplyv na aglutináciu, ale ako

\*) Prednesené na pracovnej konferencii chemických výskumníkov, technikov, zlepšovateľov a novátorov v Banskej Štiavnici v júli 1951.

bolo už raz povedané, aj mliečne baktérie, ba dokonca sme pozorovali, že aj produkty pliesní v prostredí, ktoré túto funkciu kvasiniek silne usmerňujú. Kvasinky pestované za prídania malého množstva produktov výmeny látkovej pliesne *Aspergillus niger* pozmeňujú vizuálne svoj vzhľad na výzor kvasiniek svrchného kvasenia. To je pravdepodobne v súvislosti s pozorovaním *Kiesslinga* (3), ktorý zistil, že v kultúre alkoholického kvasenia po pridaní výluhu z *Aspergillus niger* nastane zvýšenie vytvárania kyseliny mliečnej v začiatočnej fáze kvasenia. Dosiaľ menované príčiny aglutinácie treba doplniť a rozšíriť výkladmi prvopodstatnými podľa fyzikálnych a fyzikáлноchemických zákonitostí, ako je napr. permeabilitnosť bunčných blán, vylučovanie gumóznych látok, adsorptívnosť a javy elektrokinetické.

Keď sa pozeráme na kultúru mikroorganizmov, napr. kvasiniek, v tekutom prostredí ako na koloidný roztok, aglutinácia znamená vyvločkovanie koloidu a okamih, kedy aglutinácia nastala, isoelektrický bod. Podľa *Michaelisovej* (4) teórie o elektrickej dvojvrstve nesú čiastočky koloidu na svojom povrchu elektrické náboje, z roztoku ktorý ich obklopuje sa hromadia popri nich opačné elektrické náboje. Keď je napr. čiastočka vybavená na svojom povrchu zápornými elektrickými nábojmi, hromadia sa z roztoku na jej povrchu náboje kladné, takže ďalšia vrstva roztoku je o tieto chudobnejšia. Smerom do vnútra prostredia týchto nábojov ubúda a elektrokinetický potenciál sa tým smerom snižuje, pribúda opačných nábojov tak dlho, kým sa koncentrácie oboch nevyrovňajú. Môžeme tiež povedať, že hustota náboja smerom do vnútra prostredia klesá a rovná sa nule vtedy, keď koncentrácia aniónov sa rovná koncentrácii katiónov. Rovnováha je v tomto prípade analogická s rovnováhou sedimentačnou, avšak pri sedimentácii pôsobí príťažlivosť, v tomto prípade elektrické sily. Elektrická dvojvrstva má rozhranie na povrchu blany buniek kvasiniek. Táto semipermeabilná blana oddeľuje dve rôzne koloidné prostredia: plazmu bunecnú zvnútra a živný substrát zvonka. Pomery v prirodzenom živnom prostredí nie sú však také jednoduché, lebo tie isté fyzikálne zákony, ktoré platia pre suspendované mikroorganizmy, platia aj pre ostatné koloidné častice v roztoku, ako napr. bielkoviny, alebo aj mikrobiálne infekcie a pod.

Vplyv solí v prostredí sa uplatňuje podobne ako u iných koloidov, totiž schopnosť porušiť stabilitu a spôsobiť vyvločkovanie, aglutináciu, je tým väčšia, čím je vyššie mocenstvo v prostredí obsiahnutého prvku a podľa pravidla *Hardy-Schulzeho* (4) vplyv mocenstva prvku je v súlade s mocenstvom algebraickým. U aniómov sa tento vplyv stupňuje od  $\text{SO}_4^{--} < \text{NO}_3^- < \text{Cl}^-$ . Z tohto dôvodu v odborných štúdiách o aglutinácii kvasiniek sa veľmi často stretávame s pozorovaním vplyvu chloridu hlinitého, uranylového, dusičnanu uranylového alebo solí tória na mikroorganizmy. *Moldavskaja* (5) sledovala ako sa mení náboj kvasiniek účinkom chloridu hlinitého a zistila isoelektrický bod pri koncentrácii 0,01 — 0,02%. V prítomnosti želatiny sa isoelektrický bod posunul až medzi koncentrácie 0,001 — 0,05% chloridu hlinitého. Tieto látky, zvy-

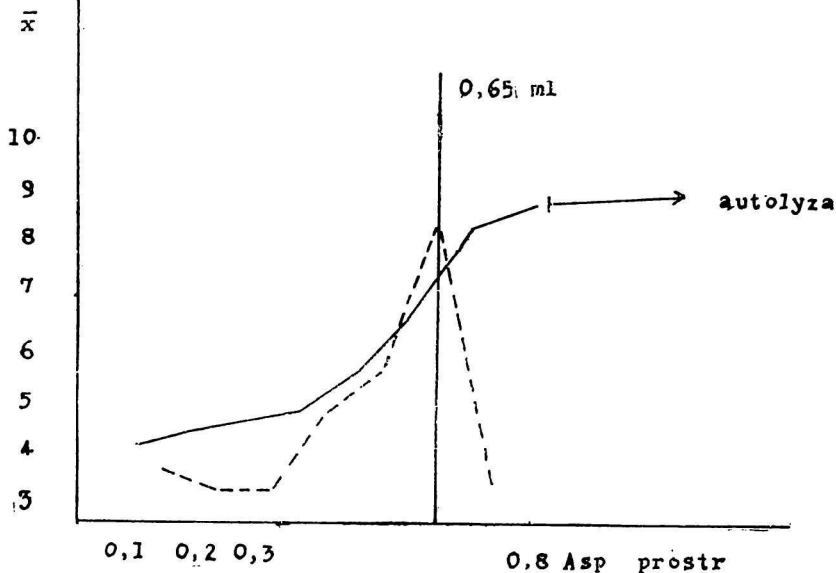
šujúce stabilitu mikrobiálneho koloidu (napr. želatina, agar, albumín, lecitín a pod.) nazývala *Moldavskaja* „sensibilátormi“ To je podobný úkaz, s akým sa stretávame pri využití týchto látok na zmiernenie účinku sníženia povrchového napätia (6).

Na stanovenie miery aglutinačnej schopnosti sa používa niektorých práve uvedených skúseností:

1. Metóda, pri ktorej sa ráta priemerný počet buniek v jednej vložke kvasiniek. Na zvýšenie aglutinačného efektu používame prísadu prostredia metabolizovaného *Aspergillum nigrom*. Štandardizácia tohto prostredia na základe analytických metód nie je jednoduchá, preto používame metódu biologickú. Stanoví sa priemerný počet buniek vždy tej istej kvasinky v jednej vložke (od troch buniek počínajúc) v rade rozličných koncentrácií *Aspergillového* substrátu. Rozdiely veľkostí vložiek najskôr úmerne stúpajú až do dosiahnutia určitej koncentrácie, ďalej sa zvyšujú len mierne a konečne nastáva autolýza buniek.

0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
4,31	4,61	4,81	5,01	5,66	6,56	8,29	8,61
0,30	0,20	0,20	0,65	0,90	1,73	0,32	

ml *Aspergillového*  
prostredia  
priemerný počet buniek  
v jednom shluku  
rozdiely medzi priemermi



Krivka v určitom bode ukáže strmé maximum a jemu zodpovedajúca koncentrácia sa môže pokladať za najviac účinnú. Priemer shlukov sa ráta z takého súboru, ktorý sa môže štatisticky pokladať za dostatočujúci.

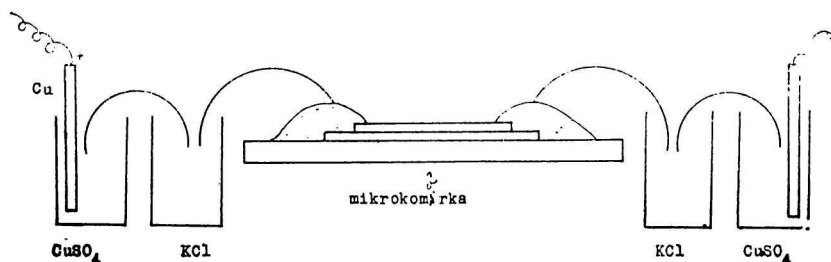
2. Používame aj orientačnú metódu, pri ktorej mieru aglutinačnej

schopnosti hodnotíme podľa koncentrácie vodného roztoku chloridu hlinitého, ktorá práve spôsobí vyvločkovanie.

3. Meranie aglutinačnej schopnosti v praxi sa prevádza na základe sedimentácie meraním ubývania zákalu nefelometricky.

4. Konečne pri pozorovaní vplyvov okolia na aglutináciu mikroorganizmov, najmä rôznych živných a dezinfekčných roztokov, využívame poznatky elektrochemické. Podľa akosti elektrického náboja na povrchu buniek pohybujú sa tieto pod účinkom jednosmerného prúdu ku katóde alebo anóde. Všeobecne sa hovorí o pohybe elektrofonetickom. Tento pohyb sa môže pozorovať a jeho rýchlosť sa dá merať zariadením, ktoré sa nazýva mikroelektroforézia. Jednosmerný prúd, ktorého potenciál môže byť ľubovoľne menený až do 300 voltov, sa zavádza do suspenzie pozorovaných mikroorganizmov v mikrokomôrkach alebo v U-trubicách. Elektródy sa nezavádzajú priamo do pozorovaného roztoku, pretože by sa na nich usádzovali častice. Používajú sa medené elektródy zavedené do roztoku modrej skalice (10% roztok) spojené agarovým mostom s nádobami s nasýteným roztokom KCl (40 g KCl, 3 g agaru, 100 ml vody). Z nádob s chloridom draselným vedú agarové mosty až k uzáverom komôrky na stolku mikroskopu, alebo do U-trubíc. Objem elektródových nádob má byť podľa *Tiselja* (7) 50—100 násobne väčší ako objem U-trubice alebo komôrky. Podľa teórie o elektrickej dvojvrstve sa dá elektroforézia vyložiť napr. tak, že bunka má pevne adheujúcu vrstvičku negatívnych nábojov, ku ktorej prilieha vrstva pozitívnych nábojov, ktorá sa vo vonkajšom elektrickom poli môže odsunúť a uvoľnené náboje sa dopĺňujú z nábojov, ktoré nesie elektrický prúd a môžu byť regenerované ešte skoršie, kým sa poruší elektrokinetická rovnováha. Na vedení prúdu má teda účasť celá bunka.

Mikrokomôrky sa pripravujú podľa *Silbereisena* (8) alebo *Krossa* a *Zuelzerovej* (9) tak, že sa na podložné sklo prilepia po stranách dva pruhy rovnobežne odrezané z veľkých krycích skiel. Uprostred zostane chodbička 2—3 mm široká. Úspešnosť pokusov závisí na rozmeroch tejto chodbičky, ktoré treba vyskúšať. Komôrka sa plní suspenziou a prikryva krycím sklom tak, aby sa vo vnútornej časti nevytvorily vzdušné bubliny, ktoré by prerušili vedenie prúdu. Naplnená komôrka sa uzatvára na obidvoch stranách rozohriatym agarom toho istého zloženia ako pre agarové mosty. Potom sa uloží na 5—10 minút do inkubátora s 4° C, optimálnej to teploty pre elektroforetickú pohyblivosť.



Suspenzie treba veľmi starostlivo pripraviť. Predovšetkým pozorovaná kultúra musí byť zbavená na svojom povrchu živného prostredia alebo prostredia, v ktorom bola zámerné máčaná. Premývanie destilovanou vodou sa prevádza centrifugáciou a opätovným resuspendovaním do destilovanej vody. Doba máčania kultúry mikroorganizmov v skúšanom roztoku má trvať iba 15 — 30 minút. Pozorovanie sa koná najosvedčenejším spôsobom v acetátovom pufru o pH 4,7 (to odpovedá 0,01 molárnemu roztoku octanu sódného). Fosfátový pufer sa pri sledovaní rôznych vplyvov solí viacmocných prvkov neosvedčil, ako zistil *Barron, Munz a Gasvoda* (10) pri pozorovaní vplyvu dusičnanu uranylového na pivovarské kvasinky a ako je tiež uvádzané *Mc Quillenom* (11) pri meraní rýchlosti elektroforetického pohybu *Escherichia coli*.

Meranie sa môže robiť dvojakým spôsobom:

1. priamym stanovením rýchlosti pohybu, alebo vypočítaním hustoty náboja na povrchu bunky, alebo

2. meraním hĺbky stredného prúdu mikroorganizmov.

Priame meranie rýchlosti elektroforetického pohybu sa vyjadruje výpočtom  $\mu$ , ktoré prebehla priemerná bunka za 1 sekundu pri potenciálnom spáde 1 V/cm. Toto stanovenie sa potom môže ďalej využiť pre zistenie hustoty nábojov na povrchu priemernej bunky.

$$\sigma = 2 \sqrt{\frac{NDT \cdot k}{2.000 \pi}} \mu \sin h \frac{\xi \cdot \varepsilon}{2k \cdot T}$$

$$\xi = \frac{4 \pi \eta}{D} v$$

$N$  = Avogadrovo číslo ( $6,0227 \cdot 10^{23}$ )

$D$  = dielektrická konštanta (pre vodu 81)

$k$  = Boltzmannova konštanta ( $1,380 \cdot 10^{-16}$  erg/grad)

$T$  = absolútna teplota

$\mu$  = iónová sila

$\varepsilon$  =  $4,802 \cdot 10^{-10}$  elektrostatických jednotiek

$\eta$  = viskozita

$v$  = elektroforetická pohyblivosť

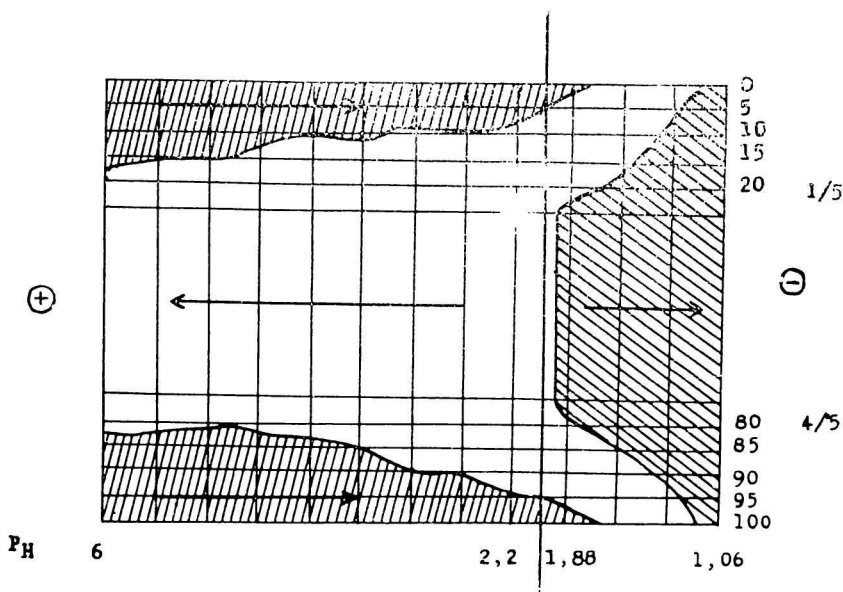
Keď sa uvážia všetky konštanty a zredukovateľné hodnoty, ukáže sa, že pre naše meranie pri používaní toho istého pufru je jedinou priemennou hodnotou rýchlosť elektroforetickej pohyblivosti. Stačí preto prevádzať posúdenie len podľa tejto hodnoty, ktorá je priamo úmerná hustote náboja na povrchu.

Pri 25° C a pri  $D$  a  $\eta$  pre vodu platí:

$$\sigma = 738.000 \sin h \frac{v}{4 \cdot \sqrt{\mu}} \text{ elektrónov}/\mu^2$$

V druhom prípade sa meria šírka stredného prúdu mikroorganizmov, lebo sa vychádza zo skúseností, že vrstvy priliehajúce ku kryciemu sklu hore a k podložnému sklu dole majú smer zapríčinený záporne nabitým sklom, ku ktorému prilieha vrstvička kladných nábojov z tekutiny komôrky. Podľa *Silbereisena* (8) treba s týmto zjavom rátať až do hĺbky 1/5 komôrky shora a od 4/5 dole. Za normálnych okolností je napr. smer hlavného prúdu anódový a smer prúdu kvasiniek v okrajových vrstvách katódový. Zmenou vonkajších podmienok aglutinácie sa najprv hĺbka stredného prúdu kvasiniek rozšíri a v isoelektrickom bode vymiznú rozdiely medzi smerom stredného a okrajových prúdov kvasiniek, takže smer pohybu všetkých buniek je katódový. Hĺbka prúdu sa meria posunom tubusu mikroskopu a zisťuje sa na stupnici mikrometrickeho šrôbu, ďalej sa potom znázorňuje schematicky. Celkové vyhodnotenie vymedzuje presne len isoelektrický bod. Oproti jednej aj druhej metóde hodaotenia výsledkov sú v literatúre uvádzané výhrady. Dnes sa pre svoju jednoduchosť najviac používa hodnotenie na základe merania rýchlosti elektroforetického pohybu.

Stanovenie podľa *Silbereisena*:



Obyčajne zdravé a fyziologicky zdatné bunky, pokiaľ sú jednotlivito v pufrí suspendované, sa pohybujú smerom k anóde, bývajú vybavené zápornými elektrickými nábojmi a rýchlosť ich pohybu je tým väčšia, čím je väčšia hustota náboja na ich povrchu. Čím je početnejší tento záporný náboj, tým je menšia aglutinačná schopnosť a opačne. Elektrická vodivosť rýchlejšie stúpa, čím sú podmienky pre život a rast kultúry

priaznivejšie. Stárnutím ubýva anódová elektroforetická pohyblivosť so stúpajúcim sklonom k aglutinácii. V okamihu, keď sa elektroforetický pohyb zmení v smere a bunky sa začnú pohybovať ku katóde, nastáva celková aglutinácia, vyvločkovanie kultúry, napr. vplyvom pH 1,8 — 2,4 u kvasiniek. Kultúry mikroorganizmov, ktoré majú už v normálnom stave charakter vyvločkovanej kultúry, napr. *Pediococcus damnosus* utvárajúci skupiny po 2,4 aj viacerých bunkách, javia katódový smer elektroforetickej pohyblivosti. Ako infekcia v kultúre kvasiniek, tak *Pediokoky* znižujú rýchlosť elektroforetickej pohyblivosti kvasiniek. Bunky *Pediokokov* sa lepia na povrchy kvasničných buniek a pod. Všetky tieto práve uvedené vzťahy sú v súlade s metabolizmom kultúry, pretože rozpad složitých látok v jednoduché znamená zvýšenie elektrickej vodivosti, zatiaľ čo syntéza znamená jej zníženie. V prípade, keď u starých buniek nastane zvýšenie elektrickej vodivosti, ide pravdepodobne o rozpad autolýzou.

#### Literatúra

1. *A. Malkov*, Zentralblt. f. Bakt. II, 90, 212, 1934;  
*A. Malkov, A. Petina, N. Zvetkova*, Ztrbl. f. Bakt. II, 88, 1933, 193.
2. *E. A. Plevako, O. A. Bakušinskaja*, Ztrbl. f. Bakt. II, 94, 64—77, 1936.
3. *W. Kiessling*, Bioch. et bioph. acta 4, 1, 1950, 193.
4. *Pauli a Valko*, Elektrochemie der Kolloide, Wien 1932.
5. *E. A. Moldavskaja*, Biochem. Ztschr. 257, 480, 1933.
6. *A. Kocková, A. Vavruchová, D. Nováková*, Schweizer Brau. Rundschau 62, 19, 1951.
7. *H. Theorell*, Die Methoden der Enzymforschung, Lipsko 1941.
8. *K. Silbereisen*, Woch. f. Brauerei 55, 20, 153, 1938.
9. *W. Kross, M. Zeulzer*, Ztrbl. f. Bakt. I. Orig. 126, 360, 1932.
10. *G. Barron, J. A. Muntz, B. Gasvoda*, Journ. Gen. Physiol. 32, 163, 1948-9.
11. *K. Mc Quillen*, Bioch. et Biophys. Acta 6, 1, 66, 1950.

## Struktura dřeva a jeho zpracování na buničinu a papír\*)

GUSTAV VINCENT

(Státní výzkumní ústav pro lesní výrobu, pracoviště Brno.)

Stoupající potřeba papíru a s ní související rostoucí výroba buničiny jsou přičinou velké poptávky po t. zv. celulosovém dříví, čili vláknině. Doby, kdy lesní hospodářství mohlo dodat celuloskám celé žádané množství vlákniny v kuláčích a štěpinách dřeva téhož druhu nebo

\*) Prednesené na pracovnej konferencii chemických výskumníkov, technikov, zlepšovateľov a novátorov v Banskej Štiavnici v júli 1951.