

Redoxpotenciál mint indikátor mikroszervezetek  
növekedésénél.

Doktori értekezés.

Irta

és a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Karához a  
vegyészdoktori cím elnyerése végett benyújtotta

K. Stur Judit  
vegyész

Szeged  
1958





Diss. | B 527





Az élő szervezetekben lejátszódó minden változás két folyamatra, ill. reakciótípusra vezethető vissza: hidrolízisre és oxido-redukcióra. A tápanyagok lebontása és a szervezet alkotóelemeinek felépítése hidrolízis, ill. kondenzációs folyamatok útján történik, az energia igényét pedig a szervezet oxido-redukciós folyamatokkal biztosítja.

Ezért a szervezetek energiaszabályozásáról, ennek kapcsán a végzett, vagy végezhető sejtmunkáról, a szabadenergiatartalomról, a rendszer oxidálóképességének vizsgálatával világos képet kaphatunk.

Mikroszervezetek tenyésztésében pl. a sejtek és a táptalaj között végmenő folyamatokat kísérő szabadenergia változást a rendszer RP-jának változása jelzi. Így a mérés útján kapott RP érték jellemző a sejtek és a táptalaj között végmenő anyagcsereére. Tekintve, hogy a sejtek metabolizmusa kapcsán számos oxidoredukciós folyamat megy végbe a tenyésztésben, a RP az összes redoxfolyamatok potenciálértékeinek eredőjét fejezi ki, éppen ezért a tenyésztés állapotáról egy általános képet ad. A redoxpotenciálból egyébként kiszámítható a te-



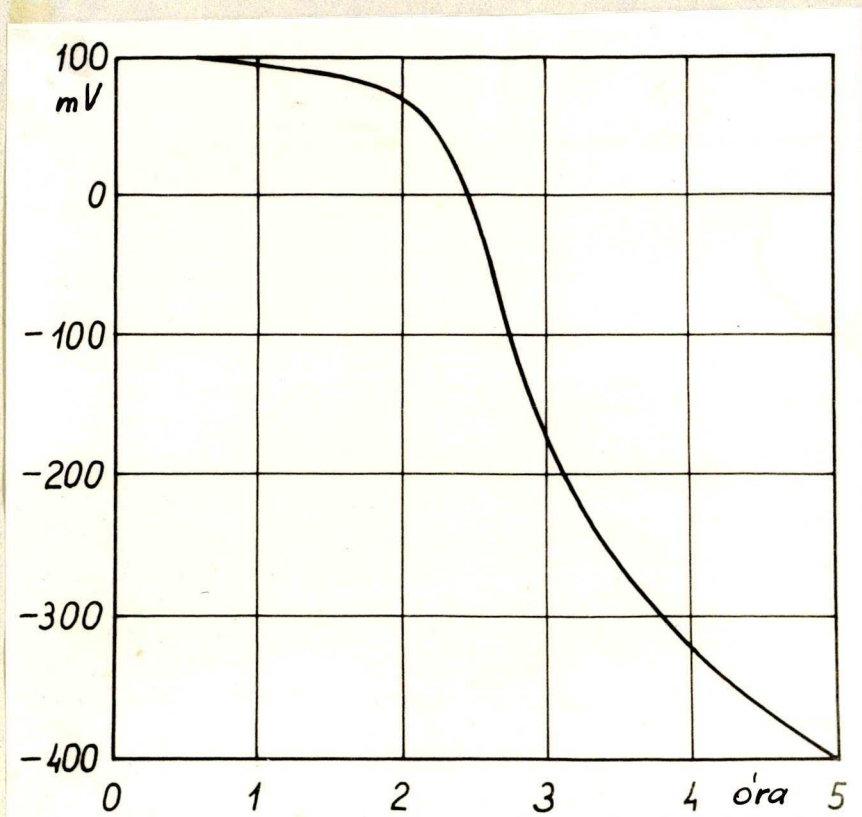
nyészetben uralkodó hidrogén parciális nyomás, amelyet a pH figyelembevételével exponens /rH/ alakban szokás megadni.

$$rH = \frac{RP - 58.pH}{29}$$

Ha egy tenyészetnek az idővel való változását koordináta rendszeren ábrázoljuk, a tenyészet anyagcseréjére jellemző RP görbét kapunk, amelynek alakjából következtetni lehet azokra az anyagcserefolyamatokra, amelyek a tenyészet életműködése folyamán a sejtek és a táptalaj között végbemennek. A RP-ből és pH-ből kiszámított rH görbe hasonló lefutású, mint a RP görbe, mivel az inkubáció alatt a tenyészetek pH-ja általában legfeljebb 2 értékkel változik.

Az ilyen módon kapott görbe anaerob és aerob tenyészetekben egyaránt a szaporodási görbével nagyjából ellenkező lefutású /1/ tehát a szaporodás lag fázisában a RP ingadozó, enyhén csökkenő, az exponenciális fázisban hirtelen, gyakran zuhanásszerű csökkenést mutat, a stationer fázisban pedig a RP érték is hosszabb-rövidebb ideig állandó, majd újra emelkedni kezd, általában azonban nem éri el a kiindulási értéket. A RP-nak ez az emelkedése rendszerint a sejtek autolízisével kapcsolatos. Az 1. ábrán egy aerob, de külön nem levegőztetett *Staphylococcus aureus* kultúra szaporodási és RP görbéje látható.





1. ábra.

Redoxpotenciál /1/ és sejtszám /2/  
változása *Staphylococcus aureus*  
Butley tenyészetben.

Miután a mikroorganizmusok szaporodásuk során a táptalaj oxigéntartalmát fokozottan kihasználják, a tenyészetek légzésének intenzitása a RP-el ellentétes és így a légzési görbe a redoxgörbének tükörképe. /2/ A redoxgörbe azonban mégis többet mutat, mint a légzési görbe, mert kifejezi azt is, hogy valamely reverzibilis redoxrendszer



oxidált, vagy redukált alakban van-e jelen.

A mikroorganizmusok növekedése, értékes vagy káros anyagcseretermékek felhalmozódása és a RP görbe lefutása között olyan összefüggések találhatók, hogy ezek alapján a tenyészetek életműködése során háromféle működési szakasz különböztethető meg:

Az első szakaszt, amelyet a fokozott táptalajfelhasználás és a tenyészet növekedése jellemez, növekedési fázisnak, a második szakaszt, amelyben a metabolitok termelése a legintenzívebb, termelési fázisnak nevezhetjük. A második fázisra esik pl. a streptomycin termelése is. A harmadik fázisban, amikor a RP állandóvá válik, a tenyészetben látszólagos egyensúlyi állapot áll be, azonban e szakaszban a metabolitok lebontása fokozottabbá válik. *Streptomyces griseus* tenyészetekben pl. e fázisban a streptomycin mennyisége rendszerint csökken. /3/

A RP tehát a növekedési fázisban csökken, a termelési fázisban emelkedik, a harmadik, egyensúlyi fázisban állandó.



É megállapításokból a tenyészetek gyakorlati felhasználására vonatkozólag ezt a következtetést vonhatjuk le, hogy ha valamilyen anyagot mikrobiológiai úton termelünk, a hozam, ill. a tenyészet kihasználása annál gazdaságosabb, minél rövidebb a növekedési fázis és azonos viszonyok mellett minél hosszabb a termelési fázis. A növekedési fázis ideje az optimális /megfelelő prokursorokat tartalmazó/ táptalaj alkalmazása mellett növekedési faktorok bevitelével csökkenthető, míg a termelési fázis meghosszabbítására a tenyészet RP-ját megváltoztató /csökkentő/ tényezők alkalmazása nyújt lehetőséget.

A növekedési fázis csökkentése céljából az idősebb tenyészetek micéliumából készítették steril kivonatot, amelyet az oltáskor a spórával együtt, vagy pedig az oltást követő napon vittek a táptalajba. Utóbbi esetben a micéliumhártya növekedése a kontrollhoz viszonyítva már néhány órában belül igen feltűnő volt.

A termelési fázis meghosszabbítására a RP minimum időpontjában - tehát a növekedési és termelési fázis határán - olyan anyagot vittek a tenyészetbe, amely annak



RP-ját tartósan csökkenti. Ugyanis a termelési fázis elnyújtása esetén a tényészetnek változatlan intenzitással kell termelnie azt a metabolitot, amelynek a fermentjei a termelési fázis redoxintervallumba esnek, illetve a RP-görbe emelkedő fázisának azon tartományában megy végbe a termelés, amelyben az illetékes fermentek reverzibilis működését a rendszerben uralkodó redoxviszonyok nem gátolják. Eszerint a RP tartós megváltoztatásával módunkban áll valamely tényészet anyagcseréjét befolyásolni.

Intézetünkben a korábban végzett vizsgálatok ezen a téren a következő eredménnyel jártak:

A kísérletek során alkalmazott redoxrendszerek 4 csoportba sorolhatók:

1./ Anorganikus anyagok, amelyek lehetnek a tényészetek szellőzésére szolgáló levegő szennyezései, vagy a fermentor anyagának korroziójából eredő ionok.

2./ Jól definiált szerves vegyületek, amelyek lehetnek test-idegenek, azaz olyan anyagok, amelyek a sejtek alkotóelemei között nem fordulnak elő, de lehetnek olyanok is, amelyeket a sejt maga termel.



3./ Nem definiált redoxrendszerek elegye, amelyeket valamely élő organizmus termel, pl. egy idegen tenyészet szürlete, vagy azonos, de különböző koru tenyészetek szürlete.

4./ Végül lehet a redoxviszonyokat megváltoztató tényező egy élő mikroorganizmus is, amely fertőzőképpen van jelen a tenyészetben, vagy pedig ugyanazon mikroorganizmus fiatalabb, vagy idősebb tenyészete.

Fermentáló oszlopban, /aluminiumból készült tányérkolonnában/ felületi tenyészetekben végzett vizsgálatok /3/ azt mutatták, hogy a tenyészetek felett uralkodó klíma, ill. a légtér gázösszetétele, mégpedig különösen a  $\text{CO}_2$  parciális nyomása döntő módon befolyásolja a tenyészet streptomycintermelését. Főleg  $\text{CO}_2$  és  $\text{H}_2\text{S}$  tartalma levegővel végeztek kísérleteket. Azt találták, hogy a  $\text{CO}_2$  parciális nyomásának a növekedése esetén a tenyészet növekedési fázisa megnyúlik, termelési fázisa pedig megrövidül. A termelési fázis időtartamának megfelelően változik a streptomycintermelés. Magas  $\text{CO}_2$  parciális nyomás esetén a termelési fázis megrövidül és a streptomycintermelés annak arányában csökken. Kénhidrogén jelenlétében a RP-görbe



szerint a növekedési fázis meghosszabbodik, azonban a termelési fázis változatlan. A RP-görbék nagyjában párhuzamosan futnak egymás mellett és ennek megfelelően a termelésben sem észlelhető lényeges különbség.

A továbbiakban olyan redoxrendszerekkel kísérleteztek, /4/ amelyek vízoldékony szilárd anyagok és nem valószínű, hogy a tenyészet metabolitjai között előfordulnak, pl.  $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{O}_3$  és difenil-diszulfid-dikarbonsav. A tioszulfát irreverzibilis redoxrendszer. A difenil-diszulfid-dikarbonsav reverzibilisen tiofenolkarbonsavvá redukálódik és feltételezhető, hogy a karboxil csoport révén a sejtek fehérjekomponenseihez hozzákapcsolódik. Valóban, a két anyag lényeges redoxváltozást idéz elő: a tenyészet RP-ja hirtelen felemelkedik, azonban az emelkedés nem tartós és különösen a difenil-diszulfid-dikarbonsavval kezelt tenyészet RP-ja rövid idő múlva követi a kontroll tenyészetet.

A jelenség magyarázata az, hogy ezen anyagok redoxkapacitása lényegesen kisebb a tenyészeténél, amely a RP-t megváltoztató tényezőket állandóan termeli és így a tenyészet a táptalajba bevitt idegen redoxrendszerek hatását kipufferebbli.



Ami a streptomycin termelését illeti, tekintve, hogy egyrészt RP emelkedéséről van szó, másrészt a kérdéses anyagokat nagy mennyiségben kellett adagolni, a kezelt tenyészetekben alacsonyabb volt.

Az előbbiekhöz hasonló eredményeket mutatnak a nehézfémekkel végzett kísérletek is /2/, amelyeket főleg azon kérdés tisztázása céljából végeztek, hogy a termelőszűz-mekben használatos vasfermentor korrozójából eredő anyagok a streptomycin-termelés szempontjából nem befolyásolják-e károsan a tenyészet anyagösszetételét. Az eredmény az volt, hogy a tenyészet RP-ját ezen anyagok még akkor sem változtatják meg lényegesen, ha nagyobb mennyiségben vannak jelen a táptalajban, illetve átmeneti redoxváltás után a tenyészet RP-ja ismét megközelíti eredeti értékét. A tenyészetekben e redoxpufferhatás igen gyorsan, vas esetében már percekben belül megnyilvánul. Kivétel a vanádium, amelynek hatására a RP és a légzés tartósan emelkedik és a zink, amely a RP-t elég alacsony értéken stabilizálja.

Az eredmények értékelésénél arra a megállapításra jutot-



tunk, hogy különbséget kell tennünk a tényészetek redoxviszonyait megváltoztató anyagok között aszerint, hogy azok a sejthez, ill. a sejtek alkotó elemeihez tartósan kapcsolódnak-e, vagy sem. A nehézfémek egy része magas pH-nál már a táptalajban kicsapódik, vagy ha hozzákapcsolódik is a sejthez, arról leválik, tehát tartós redoxváltást nem idéz elő, mert redoxkapacitása gyorsan kimerül, különösen akkor, ha irreverzibilis redoxrendszerrel /pl.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ / van szó.

Tartós redoxváltást csak akkor létesíthetünk egy tényészetben, ha olyan anyagot viszünk a táptalajba, amely a sejtek valamely alkotó elemével azonos, vagy legalább is hasonló kémiai felépítésű. Ilyen anyagok pl. a porfirin rendszerek.

Ha élesztőtényészethez marhavérből izolált vizoldékony C-hermint adnak /5/ és mérték a tényészet légzését és RP-ját, továbbá a C-herminnek a tényészetből való eltűnését, azt találták, hogy amilyen mértékben csökkent a táptalajban a C-hermin mennyisége, ugyanolyan mértékben emelkedett a respiratio, ill. csökkent a RP. A C-hermin hatása annál



tartósabb volt, minél nagyobb mennyiséget vittek be a táptalajba.

Ezek szerint tehát, ha valamely tenyészet redoxviszonyait tartósan meg akarjuk változtatni, olyan anyagokat kell a tenyészethez adnunk, amelynek redoxkapacitása a tenyésztével nagyságrendben megegyezik. Ilyen redoxrendszer lehet pl. a tenyészetben valamely fertőzésképpen megtelepedett idegen mikroorganizmus, amely állandóan termeli a RP-t meghatározó tényezőket. /7/ Ezt a hatást észlelték *Streptomyces griseus*-tenyészetek mesterséges fertőzése esetén, amikor a fertőző mikroorganizmus saját RP-ja a tenyészetét tartósan megváltoztatta.

A streptomycinnek fermentáló oszlopban való termelésénél észlelték, hogy a tenyészetek RP-ja fágfertőzés esetén megváltozik: a RP, ill. rH görbe átmeneti emelkedést mutat, amely rendszerint előbb jelzi a fertőzést, mint az a tenyészet morfológiai képén vagy a streptomycintermelésben is meglátszanék. /3/.

A RP növekedésének, illetőleg csökkenésének az a magyarázata, hogy a mérés alkalmával a különféle redoxrendszere-



rek által létesített potenciálok eredőjét észleljük. Erre vall az a kísérlet is, amely szerint két azonos, de különböző koru és ennek megfelelően különböző RP-al rendelkező *Streptomyces griseus*-tenyészet összetöltésekor a kialakult RP nagyjában megfelel a két potenciál középértékének. Fertőzés esetén a tenyészet RP szerint emelkedik, vagy csökken, hogy az adott időpontban a fertőző mikroorganizmus RP-ja mekkora, ill. a fertőzött tenyészet-hez képest hogyan változik.

A mesterséges fertőzés hatására kialakult potenciálgörbe nagyjából követi a fertőzésmentes kontrolltenyészet és a fertőző tenyészet RP-görbéjének eredőjét.

Ezek a kísérleti eredmények vezettek arra a gondolatra, hogy a RP-görbét, mint indikátort kellene felhasználni olyan mikroorganizmusok anyagcserevizsgálatánál, ahol a cél az, hogy a tenyészet állapotáról és növekedéséről minden időpillanatban, tehát folyamatosan képet kaphassunk.

A mikroorganizmusok növekedésének mérési módszerei között kétségtelenül a legpontosabb a sejtszámlálás ill. a szárazanyagtartalom mérés. Nem aggregálódó mikroszervezetek nö-



vekedése nefelometrián is követhető kristálytiszta tápoldatban. Az első módszer azonban rendkívül hosszadalmas, emellett statikus, így módon a tenyészet növekedése nem kísérhető figyelemmel, nefelometriás módszer nagy hátránya, hogy eleve zavaros tápoldatban, vagy olyan esetben, ha a mikroorganizmusok sejtjei csoportokat alkotnak, vagy pl. a felületen nőnek, nem alkalmazható. Így a RP mérés, az elektrometriás módszer szinte minimális tehetetlensége miatt, olyan lehetőséget ad, hogy valóban folyamatosan, minden időpillanatban képet alkothassunk a tenyészet növekedéséről. Így felhasználható a módszer antibiotikumokkal szembeni baktériumrezisztencia vizsgálatánál és olyan mikroorganizmusok növekedésvizsgálatánál, amely valamilyen iperilag is hasznosítható metabolitot termel.

Vizsgálataim első részében a baktériumok antibiotikumrezisztenciájával foglalkoztam. Az egyes antibiotikumok hatásmechanizmusa merőben különböző, miután az anyagcsérének más és más részébe kapcsolódnak be. Erre vonatkozólag az irodalomban számtalan adat található. A fontosabb antibiotikumok hatásmechanizmusáról a következőket tudhatjuk meg: annak, hogy valamely antibiotikum kifejthesse hatását, alapfeltétele az, hogy a kérdéses mikroorganizmus sejtjei-



hez hozzákapcsolódják, illetve behatoljon a sejt belsejébe. Ezt radioaktiv ként tartalmazó penicillinnel ki is mutatták /7,8/, sőt a penicillinnek vvt.-hez való kötődésére is végeztek vizsgálatokat /9/. D.Rowley és munkatársai feltételezik, hogy a sejt belsejében egy nagy penicillin-affinitással rendelkező centrum van: úgy látszik tehát, hogy a penicillinfelvétel direkt kémiai reakción alapszik. A streptomycinnek a sejthez való kapcsolódását P. Luis /10/ és Kenneth Mc. Opillen /11/ mutatta ki.

Antibiotikusok hatására a baktériumok morfológiailag is megváltoznak. D. Parvis /12/ és G. Brongmann /13/ elektronmikroszkóppal különböző elkorcsosult alakú sejtek keletkezését figyelte meg. A penicillin szelektív hatását Gram-positív mikroorganizmusokkal Gale és munkatársai /14/ azal magyarázták, hogy a Gram-positív és negatív mikroorganizmusok aminosav szükséglete különböző. Ugyanis míg a Gram-negatív mikroorganizmusok szintetizálni tudják aminosav szükségletüket, addig a Gram-positív baktériumoknak a táptalajban nagymennyiségű aminosavra van szükségük. Az aminosav vándorlás a sejtbe szerintük a legtöbb esetben egyszerű diffúziós folyamat, de a glutaminsav, glutamin



és hisztidin bejutása a sejtfalon keresztül biokémiai reakció eredménye. Gram-negatív mikroorganizmusokban aminosavak részére ilyen u.n. transzportmechanizmus nem létezik, vagy nem esszenciális, amiből arra következtetnek, hogy a penicillin szelektív hatása az aminosav-aszimiláció gátlásának a következménye. A glutaminsav felvételét és a nukleoproteidok szintézisét a penicillin szintén gátolja. A sejt fehérjéinek felépítésével kapcsolatban Gale vizsgálatai /15/ azt bizonyítják, hogy a nukleoproteidok felépítése penicillin jelenlétében szintén gátolt. Hasonló eredményt mutattak S. Simmonds és társai /16/ vizsgálatai is, akik kimutatták, hogy meglehetősen magas /1-10 E/ml/ penicillin adag H-leucil-glicin keverék, vagy glicin jelenlétében a növekedést nem gátolja. Ugy látszik, hogy a penicillin bakteriosztatikus hatása ezen a törzsen a glicinnek peptidbe történő beépülésének gátlásával magyarázható.

Ezeket az elméleti megfontolásokat több kísérleti tény is alátámasztja. Így Pratt és Dufrenoy /17/ megállapította, hogy penicillin jelenlétében a baktériumokban a ribonukleinsav és desoxyribonukleinsav arány eltolódik és a baktériumok elvesztik Gram-positív jellegüket. A penicillinnek a



a sejt redoxrendszerre gyakorolt hatása szerintük abban áll, hogy dehidrálja az SH-csoportokat S-S kötéseké. Megfigyelték továbbá azt is, hogy a penicillin a mononukleotidáz blokkolása által gátolja a defoszforiláló folyamatot. Ennek következtében, mint azt más szerzők is megállapították, a mononukleotidák a sejtekben felszaporodnak /18/. Gátolja a penicillin azonkívül a guanozinnak guaninra és ribozra való bomlását /19/, tehát a sejtekben a foszfor és nitrogén emelkedése penicillintartalmu táptalajon észrevehető. /20,21/ Alacsony penicillinkoncentráció esetén a táptalajhoz adott nukleinsavak képesek annak bakteriosztatikus hatását kivédeni. Végül megállapították azt is, hogy a fehérjék lebontásánál a penicillin az arginin komponens kivételével /22/ a dezaminálást gátolja.

A streptomycin hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Nehézségeket okoz az a tény, hogy különböző szenzitív mikroorganizmusoknál más-más reakció az, amelynek gátlásával a streptomycin az antibiotikus hatást kifejti. A streptomycin u.is a penicillinnel ellentétben sokféle reakciót gátol, bár e gátolt folyamatok közül nem mindegyik szükséges a baktériumok növekedéséhez. A streptomi-



cin a nukleoproteidokkal és nukleinsavakkal komplexet képez /23,24,25,26,27/, aminek következtében a sejtek felületi töltése megváltozik és ezek agglutinálódnak. Specifikus módon gátolja a diaminoxidázt /28/ és beavatkozik az inozit metabolizmusába /29,30,31/ és a pentoténsav szintézisébe. /32/ Gátol ezenkívül egy ismeretlen reakciót, amit oxalacetát-piruvát reakciónak neveznek /33, 34, 35,36/. Tbc. bacillusnál az amino-nitrogén felhasználását csökkenti, a respirációs kvociens megközelíti az endogén légzést, amiből az következik, hogy a streptomycin nincs hatással az endogén légzésre, de a szubstrát asszimilációt gátolja /37/. Érzékeny mikroorganizmusok jelenlétében a streptomycin nagyfokú enzimátlást mutat, pl. B. Colinál gátolja a tejsavas és ecetsavas erjedést /38/. A stafilococcus működését is erősen gátolja /39/. Az antibiotikus hatást a streptomycin a legtöbb baktériumnál az oxalacetát-piruvát reakció gátlásával éri el. /40,41, 42/. Erre három bizonyíték van: 1./ a reakció csak olyan streptomycin koncentrációval gátolható, amely szükséges a sejtek növekedésének teljes gátlásához. 2./ Csak olyan streptomycin-származékok gátolják ezt a reakciót, amelyek gátolják a növekedést is. /streptomycin, dehidostreptomycin, mannozido-streptomycin/. 3./ A sejtekben egyéb reak-



cikk egész sorát igen magas streptomycin-koncentráció sem befolyásolja. A Tbc. baktériusoknál, ahol ez a reakció nem ismeretes, a streptomycin a magasabb szénatom-számú zsírsavak oxidációját gátolja. /43/ Azt a tényt, hogy a streptomycin ilyen fontos anyagcserefolyamatok gátlása mellett a magasabbrendű állati sejtet nem károsítja, úgy magyarázzák, hogy a streptomycin nem hatol be a magasabbrendű állati sejtbe, mert azt különböző barrierek védik /44,45,46,47/. F. Ingrao és L. Vella /48/ ezt is vizsgálták, hogy streptomycin hatását milyen anyagokkal lehet felfüggeszteni és megállapították, hogy cisztein jelenlétében a streptomycin hatása kevésbé kifejezett. Japán szerzők szerint /49/ a streptomycin bakteriosztatikus hatásának erősségét különféle kötésben ként tartalmazó vegyületek is befolyásolják. A monoszulfid kötés /cisztein, tioszulfát és tiamin/ gátló hatásu, míg a diszulfid kötés jelenléte fokozza a streptomycin hatását.

A kloromicetin és aureomicin hatásmechanizmusáról az irodalomban kevesebb adat található. Az egyes közlemények adatai megegyeznek abban, hogy ezen antibiotikumok az érzékeny mikroorganizmusok légzését gátolják /50,51/. Meg-



állapították azt is, hogy az aureomicin az alacsonyabbrendű és a magasabbrendű szervezetek sejtjeiben egyaránt gátolja a foszforilálást /52,53,54,55/, azonkívül szenzitiv mikroorganizmusban gátolja a fehérjészintézist, a glutamát akkumulációját, de a glukóz fermentációt nem befolyásolja /56/. In vivo kialakult penicillin rezisztens *Staphylococcus aureus*-nál aureomicin hatására a penicillináz enzim képződése csökken /57/. A kloromicetin a fehérjészintézist szintén gátolja /56/, de a glukózfermentációját nem befolyásolja. A mononukleotidok akkumulációját érzékeny törzsek sejtjeiben fokozza /52/. Azonkívül a baktériumok eszteráz-fermentjeire is hat /58/. Beavatkozik a triptofán szintézisbe, valószínűleg oly módon, hogy az indolnak antranilsavvá való alakulását gátolja /59/.

A rezisztencia kialakulására ismét több elmélet ismeretes /Work és Work/ /14/, ezek azonban még alapos kísérleti alátámasztásra szorulnak. Elfogadott tény az, hogy különbség van az in vivo és in vitro penicillin rezisztencia között. Míg az in vivo kifejlődött törzsek penicillináz enzimmel rendelkeznek /60/, addig az in vitro rezisztencia az anyagcsere alapvető megváltozásában rejlik. A streptomycin re-



zisztens törzsekben az oxálacetát-piruvát-reakció eltűnik /61/. Szovjet szerzők szerint betegségben hosszabb kezelés folyamán az érzékeny törzs /62/ penicillinnel szemben nem válik rezisztenssé, míg a streptomocinnal kezelt betegeken a patogén törzsek rezisztenciája hamar kifejlődik. A rezisztencia kialakítása in vitro a penicillinnel való tartós érintkezésen kívül más módon is lehetséges. Így pl. a törzset csökkenő mennyiségű aminosavat tartalmazó táptalajon tenyésztve a törzs autotroffá válik és ezáltal penicillin rezisztenciája nő. Folsav és piridoxin jelenléte kivédheti nagyadag /0,05 E/ml/ penicillin hatását és a rezisztencia penicillin jelenléte nélkül is kialakul /63,64/. U. is fényvel történő besugárzás hatására penicillin és streptomicin rezisztens változatok /65/ keletkeznek. Ribonukleinsavnak a táptalajban való jelenléte szintén elősegíti a törzs rezisztenssé válását /66/. Szenzitív törzsek rezisztens törzssel együtt tenyésztve rezisztenssé válnak /67/, sőt elég, ha a spontán rezisztens törzs dezoxiribonukleinsavját tartalmazó táptalajon tenyésztik az érzékeny törzset /68,69/. A baktérium-sporák mindig penicillin-rezisztensek /70/. Más antibiotikumokkal szemben rezisztens



törzsek nem vesztik el penicillin érzékenységüket /71,72/.

A rezisztens és szenzitív törzsek közötti különbséget sok kutató vizsgálta. Glazmann /73/ penicillin-érzékeny és rezisztens törzsek között patogenitás, pigmentképződés, hemolízis, koaguláz-képzés szempontjából nem talált különbséget. Váci és Mihályfi /60/ 300 törzsnak vizsgálták a koaguláz termelését és cukorbontását, azonban csak a ferment aktivitásban találtak némi különbséget: rezisztens törzsek könnyebben és gyorsabban hasznosítják a dextrózt, lassabban és nehezebben a maltózt és mannitot. Penicillin jelenlétében a két különbség még kifejezettebb. Japán szerzők a penicillin-érzékenység és a baktériumok SH. csoport tartalma között szoros összefüggést találtak /74,75/. Megállapították azt is, hogy bár rezisztens és szenzitív törzsek között nincs különbség növekedésben, kolónia-képzésben és a festés módjában, a rezisztens törzseknél a toxicitás, a hemolizáló, glikolizáló, a tej- és véralvasztó képesség csökken, de a rezisztencia elvesztésével az eredeti tulajdonságok visszatérnek /76/. A törzsek aminosav-tartalmának vizsgálata azt mutatta, hogy hidrolízis előtt mind a rezisztens, mind a szenzitív törzse tartalmaz cisztint, lizint,



glutaminsavat, aszparaginsavat, glicint, szerint és oxiprolint. Hidrolízis után mindkét törzsben hisztidint is találtak. A rezisztens törzsben hidrolízis után arginint és prolint lehetett kimutatni /77/. Rezisztens törzsek látens periódusa hosszabb /78/ és a látens fázis végén több ribonukleinsavat tartalmaznak, a dezoxiribonukleinsav-tartalomban azonban nincs különbség.

Streptomycin-rezisztens Tbc-törzsek morfológiailag és festhetőség szempontjából nem különböznek az érzékenyekétől. A Bakt. Tularensis rezisztens változatánál a virulencia csökkenését észlelték. Staphylococcus sejtekben a szabad aminosavak aránya és mennyisége megváltozik. Az in vivo rezisztens törzsek tulajdonsága a penicillináz-képzés. Ez az enzim tisztán is előállítható, molekuláját 56 000-nek találták /79/. Először Abraham és Chain /1940/ bizonyította be létezését, Gram-negatív baktériusokban. Kirby /1944/ és mások penicillin-rezisztens Staphylococcus aureusból mutatták ki a penicillináz enzimet, de a rezisztencia foka és a penicillináz-termelő-képesség nem áll egyenes arányban /70./ Közepesen rezisztens törzsek aureomicin hatására elvesztették penicillináz-termelő képességüket /80/.



Klinikai szempontból egyre nagyobb a jelentősége a patogén mikroorganizmusok különböző antibiotikumokkal szemben kialakult rezisztencia vizsgálatának. Ujabban a penicillinnel való tömeges kezelés hatására a rezisztens törzsek száma mindinkább nő /81,82/. A klinikus szempontjából nem közömbös tehát a rezisztencia fokának gyors meghatározása. E kérdéssel sok hazai és külföldi szerző foglalkozott. Magyar szerzők Pirész és munkatársai dolgoztak ki először rutinszerű vizsgálatra alkalmas módszert /83/. Az ajánlott meghatározások általában két csoportra oszthatók: higitásos és agar diffúziós módszerekre. Schlipkötter /84/ összehasonlította különböző módszerek /lyukasztásos, szűrőpapír és cilindersa/ mérési eredményeit s azt találta, hogy a csőhigitásos módszer a legpontosabb. Ez a vizsgálati módszer azonban hosszú, mert meg kell várni, míg a tenyészet teljesen kinő, ami egyes esetekben több napot is igénybe vehet. Az u.n. fedőlemez test /85/, - ami gyors módszernek számít, mert 3-5 óra alatt eldönti a rezisztencia fokát, - nem kvantitatív, csak hozzávetőleges eredményt ad, ami 30 %-ban hibás.

A felsorolt irodalmi adatok szerint az egyes antibiotiku-



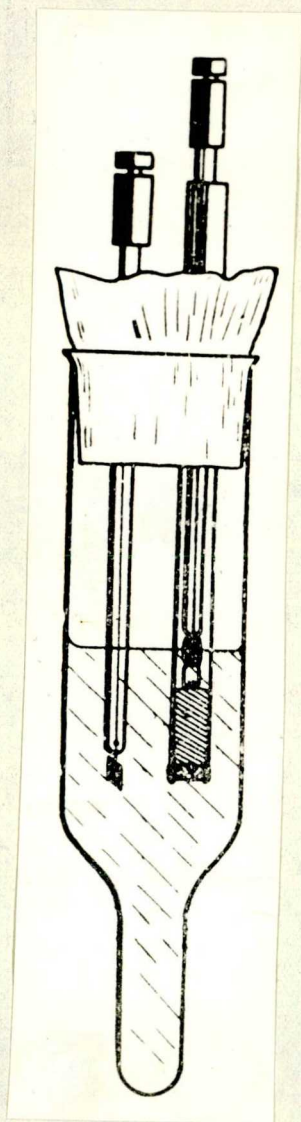
moknak a különféle mikroorganizmusokra gyakorolt hatása különböző. A rezisztencia kialakulásánál szintén újabb tényezőkkel kell számolni. Indokolt tehát egy olyan egységes módszer kidolgozása, amely alkalmas bármely mikroorganizmusnak bármely antibiotikummal szemben tenyésztett rezisztenciájának kvantitatív meghatározására. A kérdést enzimológiai vizsgálatok helyett fizikokémiai módszerekkel próbáltam megoldani és legalkalmasabbnak találtam az elektrometriás eljárást. Ha tehát valamely tenyészethez hozzáadjuk a kérdéses antibiotikumot, a tenyészet RP-ja megváltozik, vagy változatlan marad aszerint, hogy a vizsgált törzs érzékeny, vagy rezisztens a kérdéses antibiotikummal szemben. Sőt, a RP mérés eredménye azt is megmutatja, hogy melyik az a legkisebb antibiotikum-mennyiség, amelyet a vizsgált tenyészet még éppen megérez.

Baktériumkultúrák RP változásaival már Hewitt /1930/ foglalkozott /1/ és megállapította, hogy egy kultúra növekedése mindig szoros kapcsolatban van az RP változásával. Drouhet /86,87/ ugy találta, hogy penicillin bakteriosztatikus adagjainak hatására /0,5-2 E/ml/ a baktérium RP görbéje jellegzetesen megváltozik, az RP újból esel-



kedni kezd, illetve változatlan marad, ha a penicillinnek a tenyészethez való adása a beoltás pillanatában történik. E vizsgálatok azonban a rezisztencia eldöntésére nem terjedtek ki. Vizsgálataim célja éppen az volt, hogy egyrészt megállapítsam azt a legkisebb penicillinkoncentrációt, amely még képes a baktériumok RP-görbéjén változást előidézni, másrészt az, hogy egy adott törzsről RP mérés-

sel eldöntsem azt, hogy rezisztens-e vagy nem.



Vizsgálataimat a 2. ábrán látható, e célra készített, kb. 100 ml-es henger alakú edényben végeztem, melynek alsó része kőmcsőnyi vastagságú nyulványban végződik, amely a sejtszám nefelometriás mérésénél a kis rétegvastagságot biztosítja. A sterilizált edénybe helyeztem a vizsgálat

2. ábra. Baktériumtenyészetek redoxpotenciál és nefelometriás vizsgálatára szolgáló edény. Az edényt lezáró vattadugóban van a RP mérésre szolgáló platinaelektrod és a kalomelektrod csatlakozásához szükséges anyaglemezrel lezárt HCl agercső. Az edény alsó összehajló része helyezhető a nefelometerbe.



céljára használt szenzitiv, ill. rezisztens *Staphylococcus aureus*-tenyészeteket, amelyeket a következő módon készítettem: 24 órás ferde-agar tenyészetéről kacsnyit oltottam 9 ml lóhús bouillonba /pH 7,2/, majd abból 24 óra múlva ismét kacsnyit vittem újabb 9 ml táptalajba, és ennek 16 órás tenyészetét úgy higitottam, hogy a sejtszám  $275 \cdot 10^6$ /ml legyen. 0,5 ml-t használtam inokulumként ebből a baktériumszuszpenzióból. Az állandó sejtszám elérése céljából mindig azonos koru tenyészeteket alkalmaztam és vizsgálat előtt azokat nefelometriás mérés alapján azonos értékre higitottam.

A kísérlethez használt törzsek: 1. Szenzitiv *Staphylococcus aureus* Butley, 2. Rezisztens, szesváladékból izolált *Staphylococcus aureus*. Mindkét törzset a Szegedi Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Intézetétől kaptam.

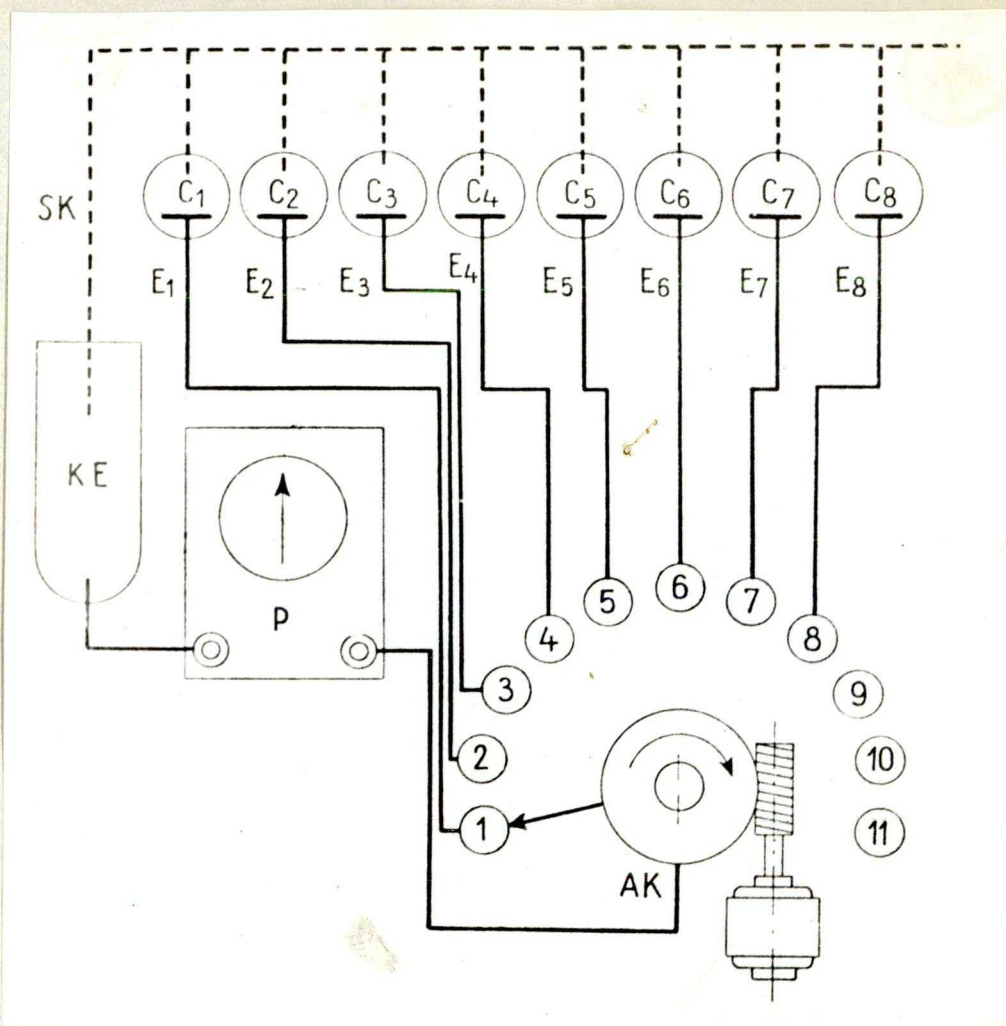
A RP meghatározására, intézetünkben használt, Kovács által kidolgozott telített kalomel elektróddal szemben kapcsolt sima platina-, ill. aranyelektródot használtam /88/. A kialakult RP-t Methrom-féle titriszkóppal mértem. Az elektródokat a tenyészetbe mélyen belemártottam, a RP mérés tehát gyakorlatilag anaerob körülmények között történt. A mérési



eredményeket normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva adtam meg. A kalomel elektródot és a titriszkópot a kísérletek kezdeti részében kézzel kapcsoltam minden mérendő elemhez és a szokásos KCl agar-csővet használtam szekundér vezető gyanánt. A későbbi vizsgálatoknál azonban a több lombikból álló sorozat méréséhez elektromos meghajtású kommutátort szolgált /3. ábra/. A szekunder vezetést nagyobb távolságból való méréshez 1-2 % glicerin tartalommal telített KCl oldattal átitatott és gumirozott szigeteléssel bevont kábel biztosította. Ez a tömeges méréseket nagymértékben meggyorsította, azonkívül az az előnye is megvolt, hogy minden méréshez u. az a kalomel elektród szolgált, ami által a hibalehetőség csökkent.

A baktériumok sejtszámát mérés közben Pulfrich-féle nefelometerrel ellenőriztem, amelyhez a sejtszámnak megfelelő kalibrációs görbét készítettem. A méréskor 48,5 ml húslevest tettem az edényekbe, majd a beépített elektródokkal együtt 120 fokon 30 percig sterilizáltam. A beoltás 0,5 ml inoculummal történt. A szükséges penicillint 1 ml steril fiziológiás NaCl-oldatban szuszpendálva vittem a tenyészetekbe. Az összmennyiség így minden edényben 50 ml volt. A





3. ábra.

A redoxpotenciál mérése nagyszámu kulturában. C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> a kulturákat tartalmazó cellák, E<sub>1</sub>-E<sub>8</sub> a tenyészetbe merülő platina elektródok, KE kalómelel elektród, P elektronikus potenciometer, AK automatikus kapcsolószerkezet, SK szekundervezető kábel.

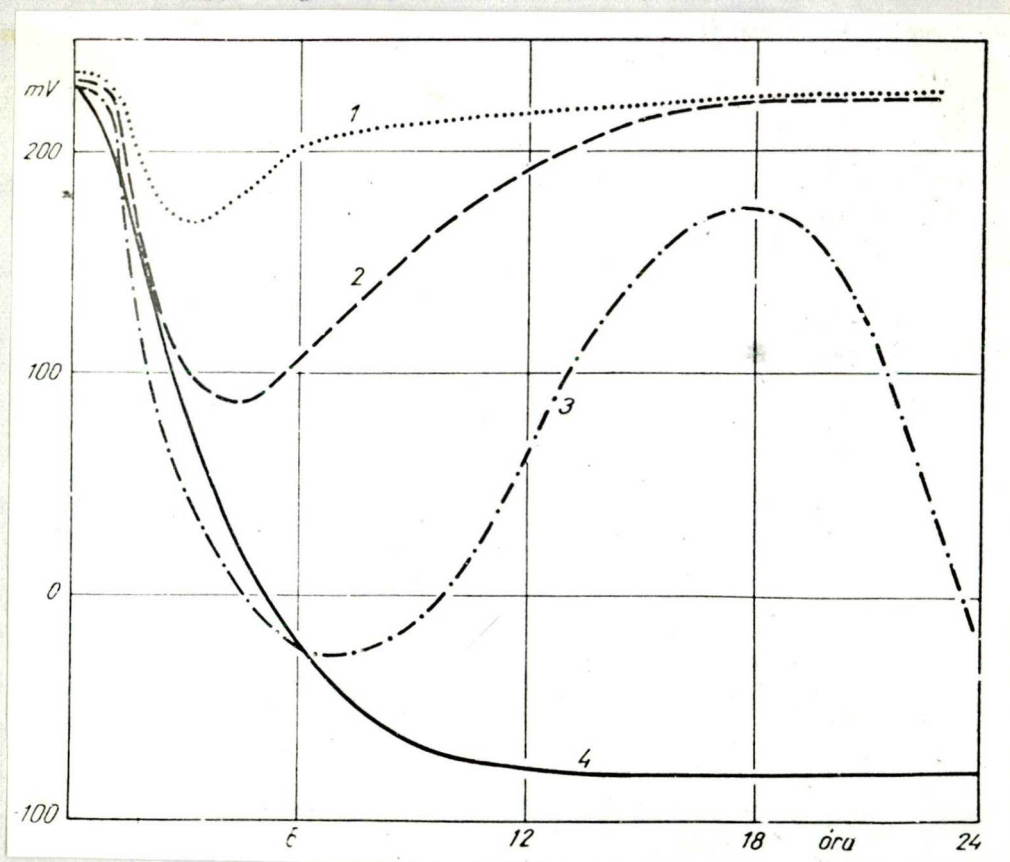
kontroll tenyészethez 1 ml fiziologias NaCl-ot adtam. Mérés alatt a tenyészetet 37 fokos vízfürdőben tartottam, amelynek hőfokát Höppler-féle ultratermosztáttal biztosítottam.

Kísérleteim első részében a penicillinnek a tenyészetbe



való bevitele a tenyészet logaritmusos növekedési fázisában történt, a beoltás után kb. 2 - 2 1/2 óra múlva, amikor a RP értéke normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva kb. +100-120 mV volt. Ekkor azt tapasztaltam, hogy a penicillin hatására az RP emelkedni kezd, s néhány óra múlva eléri a be nem oltott husleves RP-értékét. E módszerrel 0,0005 E/ml penicillin volt kimutatható.

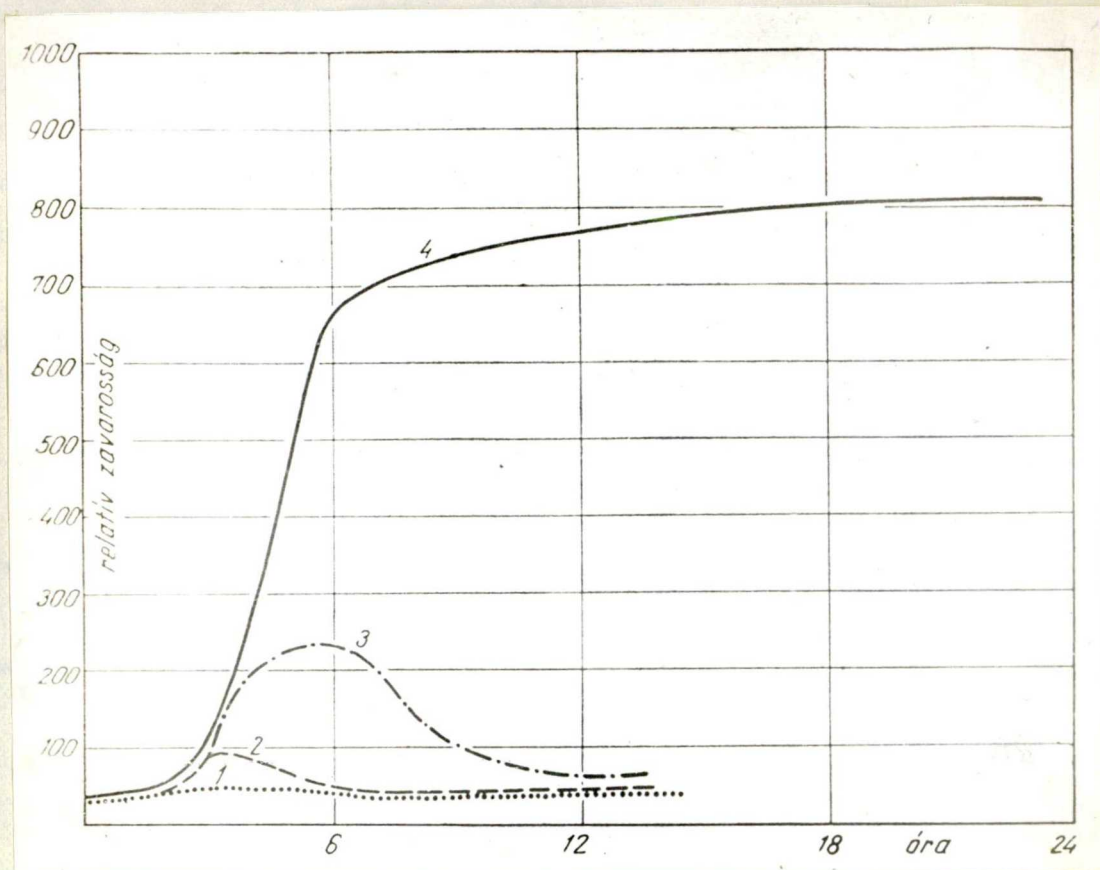
Kísérleteim második részében /4. ábra/ a penicillint a beoltással egyidejűleg adtam a tenyészethez, amikor a RP



4/a. ábra.

A redoxpotenciál változása penicillin hatására szenzitiv *Staphylococcus* tenyészetben. Az 1. sz. görbe 0,001, a 2. sz. 0,0005, a 3. sz. 0,00025 E/ml penicillin hatására beálló RP-változást mutatja. A 4.sz.görbe a kontrolltenyészet, amely penicillint nem kapott.





4/b. ábra.

Csírászám változása penicillin hatására szenzitív *Staphylococcus* tenyészetben. /A csírászámot nefelometerrel mérve a relatív zavarosság fejezi ki./ Kezdeti csírászám  $2,75 \cdot 10^8$  pro ml. Gorbék jelölése, mint a 4/a ábrán.

még nem csökkent. Ilyenkor azt tapasztaltam, hogy megfelelő mennyiségű penicillin hatására a RP a penicillinmentes kontrolléhoz képest nem csökkent és így a penicillin hatását az előző kísérletsorozathoz képest előbb észleltem. E módszer érzékenyebbnek bizonyult az előbbinél, ugyanis így  $0,00025$  E/ml penicillint is ki tudtam mutatni.

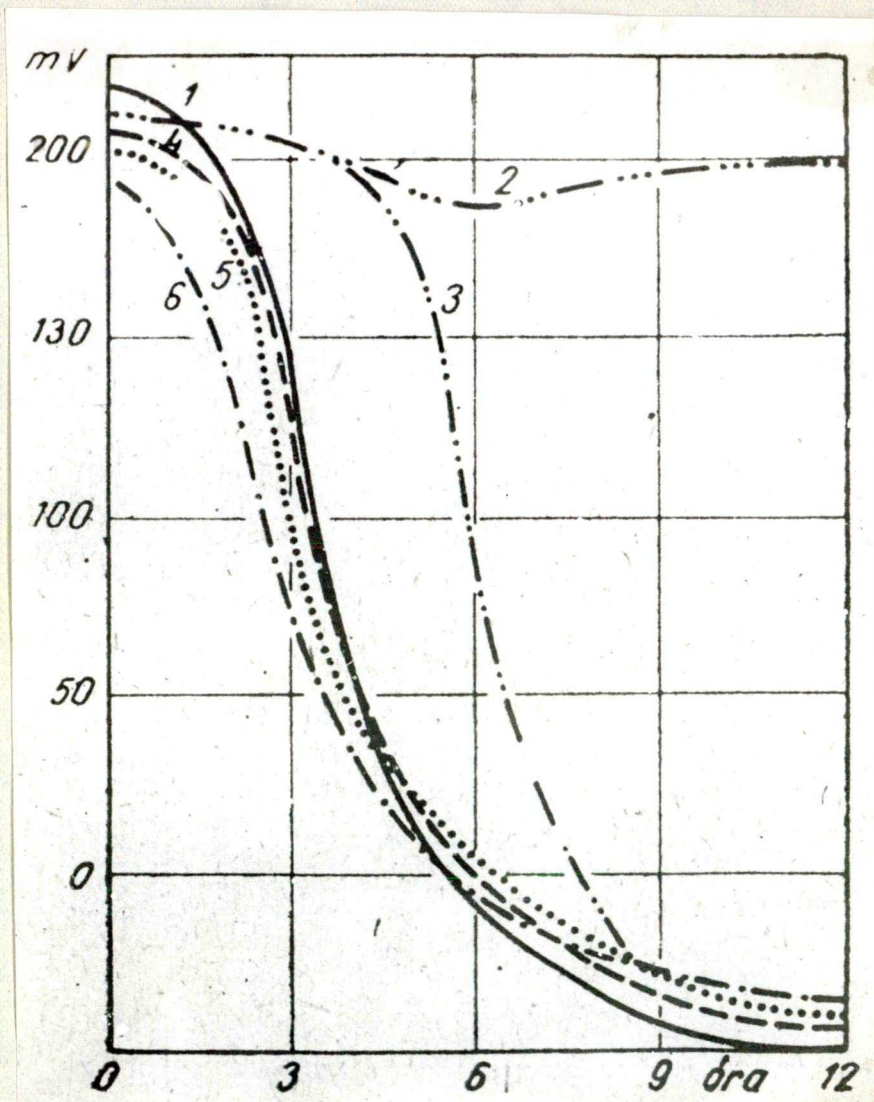


A penicillin hatására bekövetkező csiraszámváltozást nefelometerrel követtem.

Betegből izolált, in vivo kialakult rezisztens törzssel is végeztem az előző metodika szerint vizsgálatokat annak megállapítására, hogy vajon a rezisztens törzs tenyésztésnek RP-ját képes-e a hozzáadott penicillin megváltoztatni. A várakozásnak megfelelően azt találtam, hogy a beoltás után a tenyészethez adott penicillin a RP-görbén nem okozott változást. A fent ismertetett módszerrel különböző mennyiségű penicillinnel szemben rezisztens törzseket vizsgáltam /5. ábra/ és azt találtam, hogy a tenyészet RP-görbéje pontosan annyi penicillin hatására marad változatlan, amennyivel szemben a tenyészet rezisztens. Ennél nagyobb mennyiségű penicillin hatására a rezisztens tenyészet RP-ja úgy változik meg, mint a szenzitív /3. ábra, 2. görbe/. A határkoncentráció a görbe alakját nem változtatja meg, de időben kissé eltolja /3. ábra, 3. görbe/. A RP-görbén jelentkező változások a beoltástól számított 4-5 óra alatt érzékelhetőkké váltak, így a rezisztencia ténye és foka ez idő alatt eldönthető. Az elektrometriás módszerrel parallel csőhígításos és agardiffúziós módszerrel is végeztem re-



zisztenciameghatározást. Ez utóbbi eljárások azonban hosszabb időt vesznek igénybe, eredményeik nagyobb hibahatárok között ingadoznak és kevésbé érzékenyek.



5. ábra.

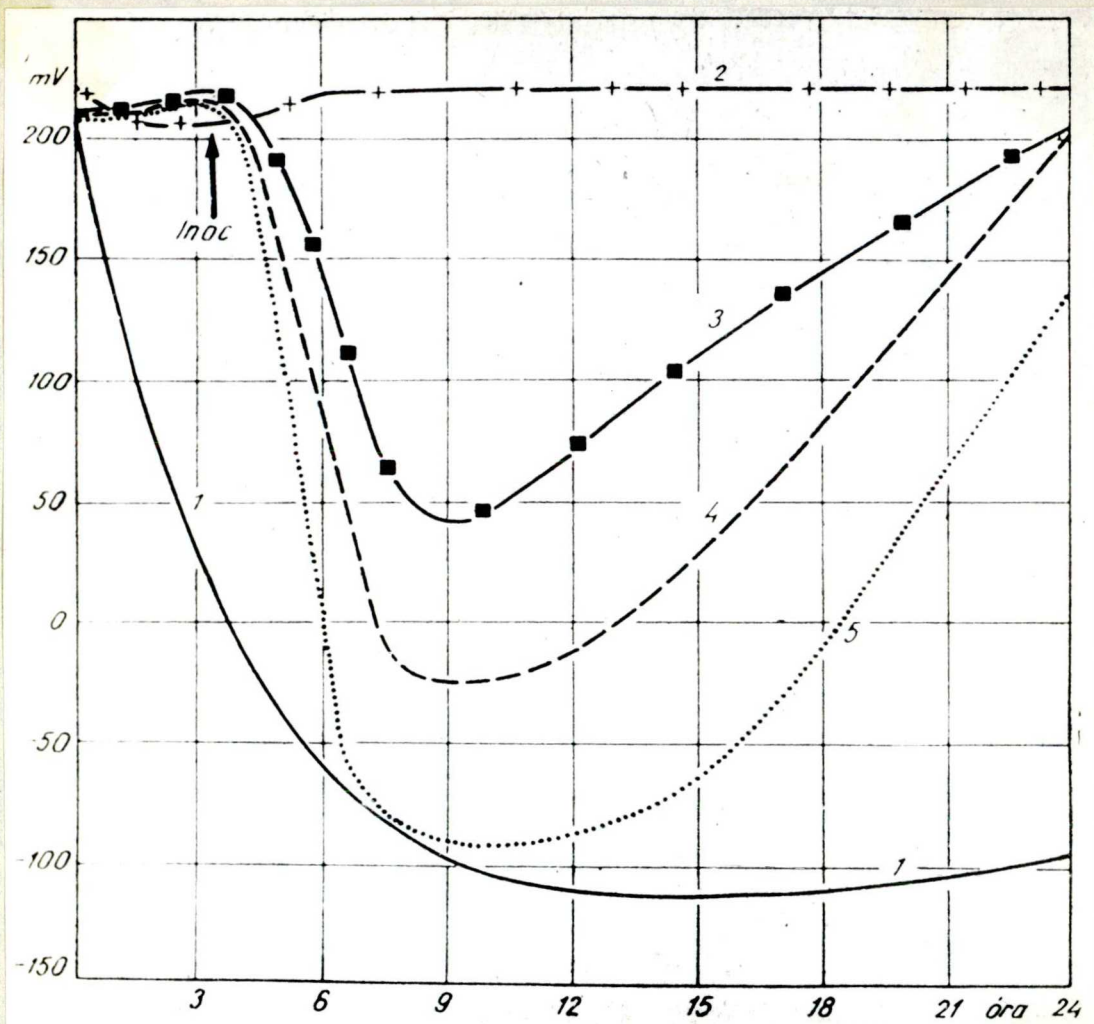
A redoxpotenciál változása penicillin hatására rezisztens *Staphylococcus*-tenyészetben. Az 1. sz. RP-görbe a penicillinnel nem kezelt kontrolltenyészeté. 2.sz. görbe 20, 3.sz. 15, a 4.sz. 10,0 az 5.sz. 1,0 a 6.sz. 0,001 E/ml penicillin jelenlétében mutatja a RP-változást. Amint az ábrából kitűnik, a rezisztens törzs penicillinnel tenyészetének RP-görbéi 10 E/ml alatt gyakorlatilag azonos lefutásúak a kontrolltenyészetével.



Kísérleteket végeztem az irányba is, hogy a szenzitív *Staphylococcus* tenyészet penicillin hatására megváltozott RP-ját milyen mennyiségű csirával lehet ismét eredeti értékére visszaállítani. E vizsgálatokat abból a célból végeztem, hogy az in vitro kísérletek eredményéből esetleg következtetéseket lehessen venni az in vivo újrafertőzések esetére. Kísérleteim azt mutatták, hogy 0,1 E/ml penicillinnel kezelt tenyészetekben a változatlan értékkel magasra futó RP az újrafertőzés után átmenetileg leesik, majd bizonyos idő után ismét megközelíti a penicillinnel kezelt, de utólag nem fertőzött kontroll-tenyészet RP-ját. Megállapítottam azt is, hogy a RP esése egyenesen arányos az újrafertőzéskor bevitt *Staphylococcus* csira mennyiségével./6. ábra./ Az újrafertőzés általában akkor történt, amikor a penicillinnel nem kezelt kontroll-tenyészet RP-ja a penicillinnel kezeltkéhez képest 200 mV-tal esett. Ez az oltást követő 3-4 órában következett be. Az újrafertőzést nefelometrikus méréssel beállított, határozott csiraszámot tartalmazó huslevestenyészzettel végeztem. Amint az ábrából kiderül,  $40 \cdot 10^6$  <sup>ml</sup> pro ml csiraszámmal történő újrafertőzés volt szükséges ahhoz, hogy a tenyészet RP-ja legalább átmenetileg elérje a peni-



cillinmentes staphylo-tenyészet RP-értékét. Azonban ez esetben is, az újrafertőzés hatása átmeneti volt, a RP-érték 24 óra múlva az eredeti - újrafertőzésen át nem esett - 2. görbe értékét éri el.

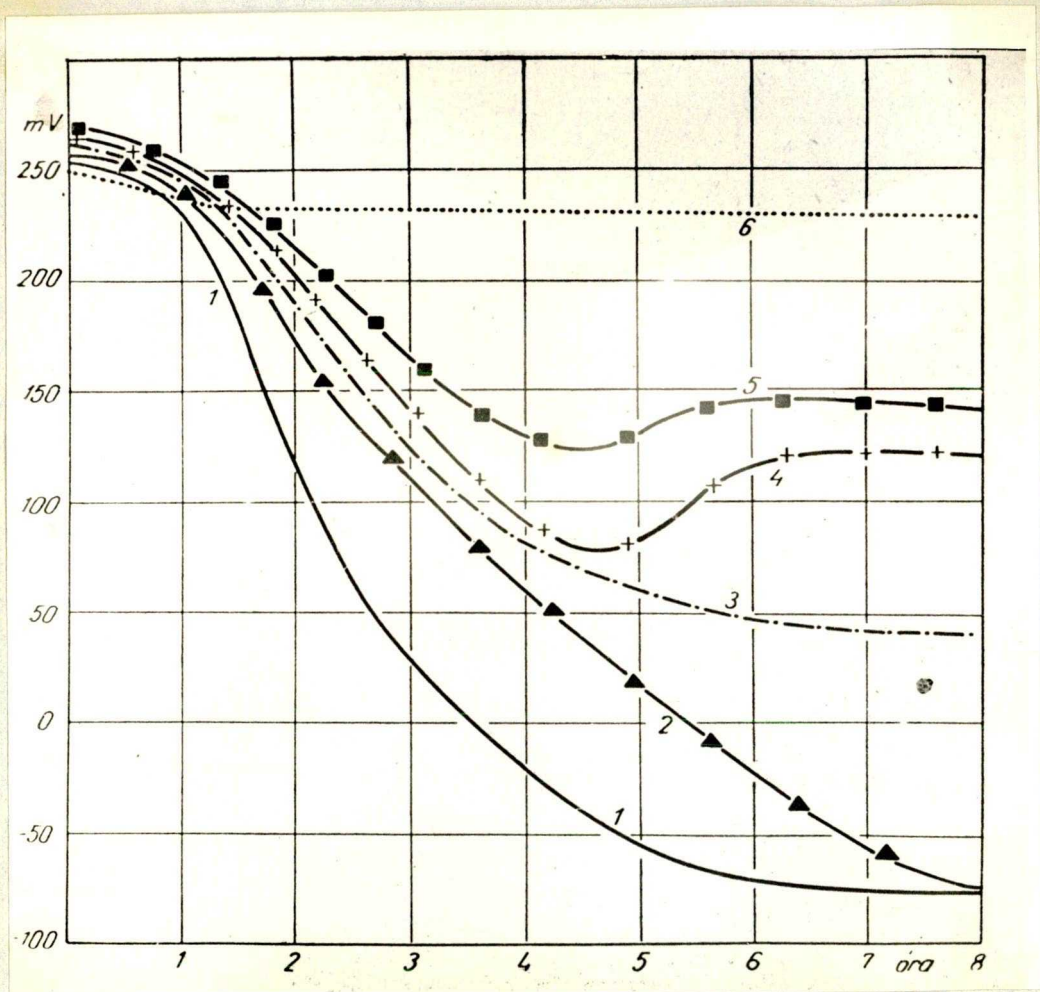


6. ábra.

A redoxpotenciál változása penicillinnel kezelt, majd újrafertőzött szenzitív Staphylococcus tenyészetekben. Az 1.sz. RP-görbe a penicillint nem kapott kontrolltenyészeté. A 2.sz. görbe a 0,1 E/ml penicillinnel kezelt tenyészeté, mely újrafertőzést nem kapott. A 3., 4., 5. sz. görbe 0,1 E/ml penicillinnel kezelt tenyészetéhez tartozik, ezek közül a 3.sz.  $10 \times 10^6$ , a 4.sz.  $20 \times 10^6$ , az 5. sz.  $40 \times 10^6$  csira újrafertőzést kapott a tenyészet ml-jére vonatkoztatva. /Az eredeti csiraszám valamennyi kísérletnél  $2,75 \cdot 10^6$  pro ml. volt/. A nyíl az újrafertőzés idejét mutatja.



Az előzőekben ismertetett metodikával megvizsgáltam ugyanannak a *Staphylococcus* törzsnek streptomycin hatására bekövetkező RP-változását is, amely penicillinnel szemben igen érzékenynek bizonyult. A kísérletek eredményeit a 7. ábra mutatja. E törzs streptomocinnal szemben sokkal ke-



7. ábra.

A redoxpotenciál változása streptomycin hatására szenzitív *Staphylococcus aureus* tenyészetben. Az 1. sz. RP-görbe a streptomocinnal nem kezelt kontroll-tenyészeté. A 2.sz. görbe 0,5, a 3.sz. 1,0, a 4.sz. 2,0, az 5.sz. 4,0, a 6.sz. 8,0 E/ml streptomycin hatására beálló RP-változást mutatja.

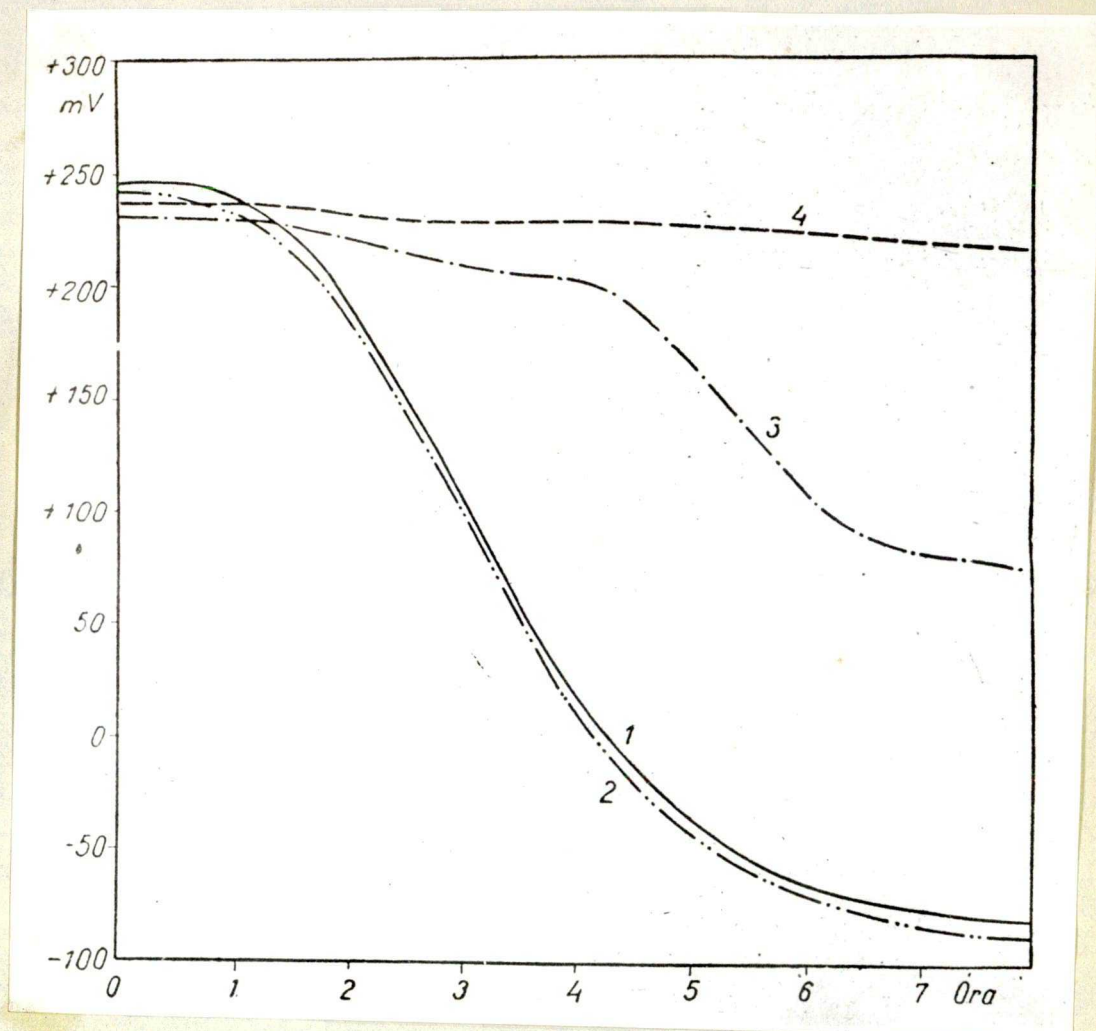


vésőbbé érzékeny, mint penicillinnel szemben. A 7. ábra szerint a törzs streptomycin-érzékenységének határa 0,5-1 E/ml között mozog.

További kísérletekben a szélesebb antibiotikus spektrummal rendelkező antibiotikumok /aureomicin és kloromicetin/ hatását vizsgáltam ugyanarra a tesztorganizmusra nézve. Azt találtam, hogy a beoltással egyidejűleg a tenyészethez adott aureomicin hatására a RP-görbe aszerint változik, hogy milyen mennyiségű aureomicint adtam a tenyészethez. Az általam használt törzsnél a határkoncentráció /az az aureomicin mennyiség/ml, amely a használt törzs növekedését még éppen gátolja/ 1 E/ml volt. Ilyen mennyiségű aureomicin hatására a vizsgált tenyészet RP csökkenése bekövetkezik ugyan, de később, mint a kontroll /aureomicint nem kapott/ tenyészeté. Ennél több aureomicin hatására a RP állandó szinten marad, a tenyészet tovább nem szaporodik. Kevesebb aureomicin hatására a RP-görbén már nincs észrevehető változás /8. ábra/.

Ha összehasonlítjuk a penicillin és aureomicin által hatásos koncentráció esetén okozott RP változást, azt látjuk,





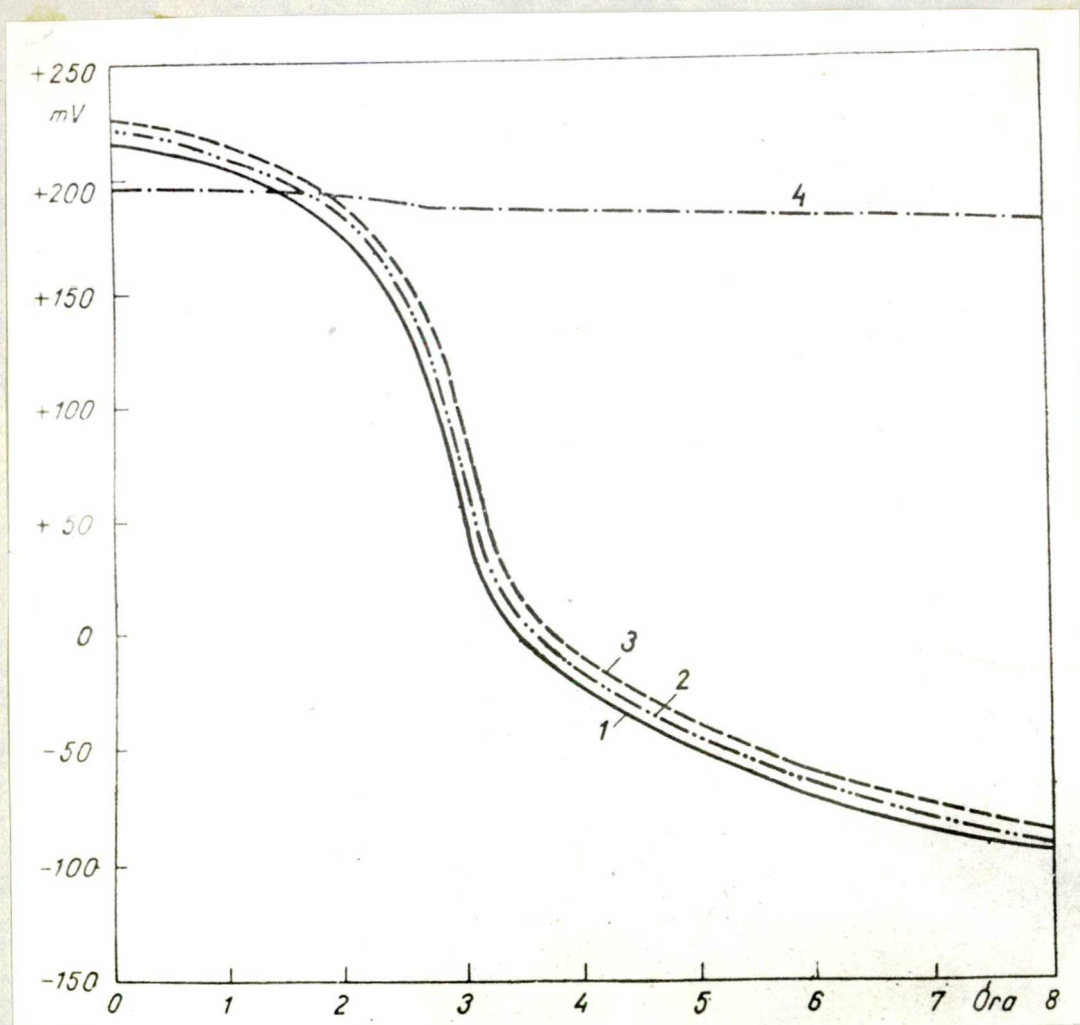
8. ábra.

A redoxpotenciál változása aureomicin hatására *Staphylococcus aureus* Butley tenyészetben. Az 1.sz. RP-görbe az aureomicinnal nem kezelt kontrolltenyészeté. A 2.sz. görbe 0,1, a 3.sz. 1,0, a 4.sz. 10,0 E/ml aureomicin jelenlétében mutatja a RP változást.

hogy míg a penicillin egy átmeneti RP csökkenést okoz, az aureomicinnál az RP-görbe megkülönböztetőleg párhuzamos az abszcisszával. A két antibiotikum hatásmechanizmusának különbsége tehát a RP görbén is kimutatható. Florozetin



esetében a görbék lefutása hatásos koncentráció esetén, az előbbiekkal teljesen megegyezett. /9. ábra/. A különbség csupán az, hogy a használt törzs a kloromicetinre kevésbé érzékeny, így jóval nagyobb mennyiség volt szükséges a RP észrevehető megváltoztatásához.



9. ábra.

A redoxpotenciál változása kloromicetin hatására *Staphylococcus aureus* Butley tenyészetben. Az 1.sz. RP-görbe a kloromicetinnel nem kezelt kontrolltenyészeté. A 2.sz. görbe 0,1, a 3.sz. 1,0, a 4.sz. 10,0 E/ml kloromicetin hatására beállt RP változást mutatja.



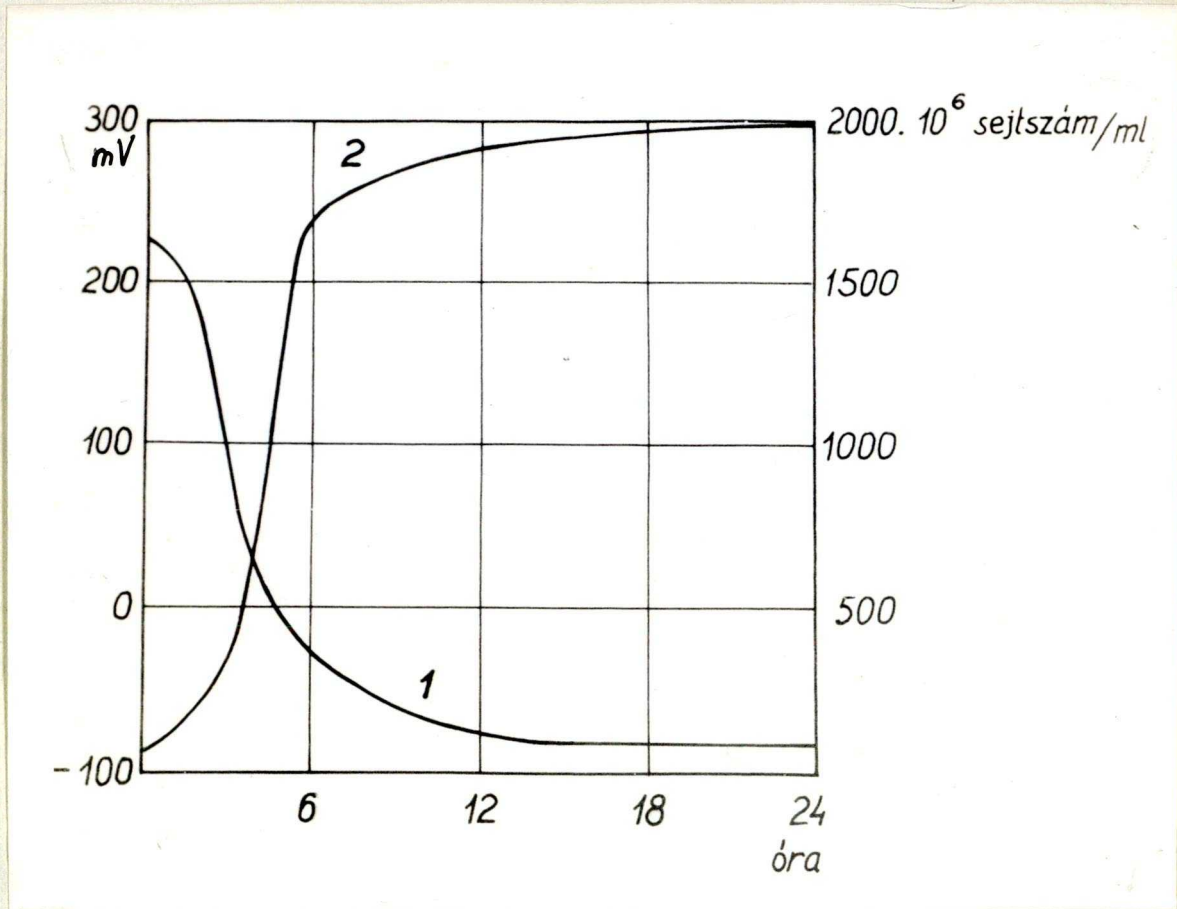
A kísérletek kiszélesítése céljából más mikroorganizmusokkal is végeztem hasonló kísérleteket, pl. többféle coli bacilussal, az eredmények teljesen megegyeztek a *Staphylococcus aureus*sal kapott eredményekkel.

Annak bizonyítására, hogy a RP-görbének ez a lefutása a baktériumtenyészeteknél karakterisztikus és nem a táptalajban lejátszódó folyamat csupán, in vivo is végeztem méréseket. Patkányok hátának laza subcután szövetébe operált Pt elektród és az állat anusába helyezett rudalaku kalomel elektród alkotta a mérendő cellát. Az állatokat colival fertőzve, a RP-görbe lefutása teljesen hasonló volt az in vitro eredményhez /10. ábra/.

Ismeretes, hogy antibiotikumokkal szembeni rezisztencia nem csupán a patogén mikroorganizmusok tulajdonsága. Így pl. a streptomycin magasabb koncentrációban beavatkozik a *Streptomyces griseus* anyagcseréjébe, a sejtek oxalacetat-piruvat reakcióját gátolva. Miután ez a jelenség igen hasonló az előzőekben ismertetettekhez, érdekesnek látszott a streptomycinnek a *Streptomyces griseus* kulturák RP-jára gyakorolt hatását elektrometriásan megvizsgálni. Ebből a



streptomycin termelésre következtetést vonhatunk le.



10. ábra.

A redoxpotenciál változása *E. colival* fertőzött patkánynál.

Ezeket a méréseket a következőképpen hajtottam végre: A *Streptomyces griseus* 100 ml táptalajt tartalmazó 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban tenyésztettem, amelyekbe a Pt elektród és a kalomel elektródot befogadó, műzatlán porcelánlappal lezárt, KCl agarral töltött üvegcső a sterilizálás

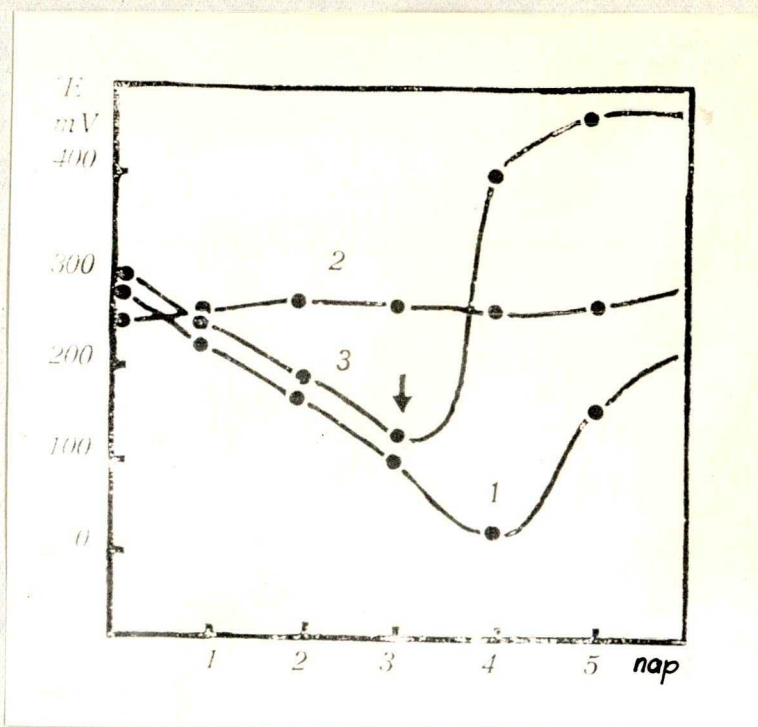


előtt papírvatta dugó segítségével be lett építve. A táptalaj összetétele a következő: Glukóz 36,0 g; Na-laktat 11,2 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,68 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  14,37 mg;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  4,28 g; KCl 4,47 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,46 g;  $\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  84,5 mg; dest.viz ad 1000 ml. PH a sterilizés után: 7,0. A használt törzs a Kőbikula-ból kapott, 134 jelzésű Streptomyces griseus volt. A beoltáshoz lombikonként 1-1 azonos koru ferdeagar tenyészetet alkalmaztam. A streptomycin hozzáadása részben a beoltás előtt történt, részben a harmadik napon, amikor a kulturák RP-ja +100 mV-ot ért el. A tenyészeteket mágneses ingarázógépen rázattan 24 C<sup>o</sup>-os termosztátban. A kísérletek során azt találtam, hogy 1000 E/ml streptomycin hatására a tenyészetek RP-ja nem változik, míg a kontroll-tenyészetekben csökkenni kezd, a 4. nap eléri a minimumot.

Ha a streptomycint 3. nap edtem a kulturákhoz, a már lecsökkent RP értéke újra emelkedni kezdett, sőt a kiindulási értéket is lényegesen meghaladta /ll. ábra/.

Mikroszervezetek tenyészeiben végzett korábbi redoxpotenciál vizsgálataim alapján felmerült annak lehetősége, hogy ipari fermentációknál RP-mérés segítségével a termeléssel





11. ábra.

A redoxpotenciál változása streptomycin hatására *Streptomyces griseus* tenyésztésben. Az 1.sz. RP-görbe a streptomycinrel nem kezelt kontrolltenyésztésé. A 2. és 3.sz. görbe 1000 E/ml streptomycin hatására beállító RP változást mutatja. 2.-nál a beoltás pillanatában, 3.-nál a nyíllal jelzett időpontban adtam a tenyésztéshez a streptomocint.

kapcsolatos, főleg üzemellenőrzést érintő kérdéseket tisztázni lehetne. Mivel az aszkorbinsavgyártás alapanyagát képező szorbóz fermentációs úton való gyártása nemzetgazdaságilag egyre jelentősebb művelet, vizsgálataimat elsősorban a szorbózt termelő *Acetobacter Suboxydans* tenyésztéseire terjesztettem ki.

A vizsgálatok célja elsősorban annak eldöntése volt, hogy



a szorbóz termelése során mért redoxpotenciál, ill. redoxgörbe alkalmas-e annak megállapítására, hogy:

- 1./ a tenyészet megfelelő-e inokulum céljára;
- 2./ a tenyészet nem fertőzött-e;
- 3./ a redoxgörbe melyik fázisára esik a szorbóz termelése;
- 4./ a szorbóz termelés befejezése a redoxgörbe alapján megállapítható-e?

A fenti kérdések eldöntésére először is azt kellett megállapítani, hogy mekkora az a redoxpotenciál különbség, amely a tenyésztés során aerob kulturákban kialakul. Általános szabály ugyanis az, hogy felületi tenyészetekben a RP változás sokkal nagyobb, mint levegőzött kulturákban. Ennek oka az, hogy a levegőzött /süllyesztett/ kulturákban a táptalajban uralkodó oxigén parciális nyomása sokkal nagyobb, mint felületi tenyészetekben.

Elméletileg azt várják, hogy maximális oxigénellátottság esetén a redoxgörbe az abszcisszával párhuzamos egyenes, azonban minden tenyészetnek van egy, az oxigén tenziótól független saját redoxgörbéje, amely némely esetben 200 - 300 mV redoxváltozást is képviselhet. A mérési hibahatár,



amely azonban nem az elektróda és a műszer pontatlanságából ered /ez legtöbb esetben 1-2 mV/ hanem a levegőzés és hőmérséklet ingadozása stb. következtében áll elő, 20-30 mV is lehet, éppen ezért a potenciálgörbéből csak akkor vonhatók le következtetések, hogyha az legalább 100 mV ingadozást tartalmaz.

A kísérletekhez használt törzs a budapesti Egyesült Gyógyszer- és Tápszergyártól kapott, Fáczián István által izolált *Acetobacter Suboxydans* volt. A táptalajok összetétele:

a./ Roux-palack tenyészeteknél:

agar-agar	30 g
kukoricalekvár	50 g
élesztőkivonat	5 g
$\text{CaCO}_3$	20 g
sorbit szirup	100 g
deszt. víz ad	1000 g

pH: 6,5

b./ lombiktenyészeteknél és fémfermentorokban:

sorbit	267 g
$\text{CaCO}_3$	3 g
habzásgátló	18 g



élesztőkivonat 3 g

vízvezetési víz ad 1000 g

pH: 6

Az inokulálás lombikkulturáknál 2 napos 30<sup>o</sup>-on inkubált Roux-palack tenyészetéről történt, amelyet 50 ml fiziologiai NaCl, később pedig Mészán I. ajánlatára 50 ml 5 %-os sorbitoldattal üvegyöngy segítségével lemostam, majd a baktériumszuszpenzióból injekciós fecskendővel 5-5 ml-t vittem a 195 ml táptalajt tartalmazó 1 literes, vattadugóval lezárt lombikokba. Így biztosítottam azt, hogy parallel vizsgálatoknál minden lombik azonos térfogatban azonos csíraszám legyen. A vattadugó tartalmazta a mintavevőt, a Pt. elektródot és a kalomel elektródával összekötő KCl agarcsövet.

Az aluminium, ill. saválló acél fermentoroknál 5 1/2 liter táptalajt oltottam be 2 napig 30<sup>o</sup>-on levegőztetett előtenyészet 1/2 literével. A baktériumok növekedését mikroszkóppal ellenőriztem, nativ, ill. metilénkékekkel festett készítményekben.



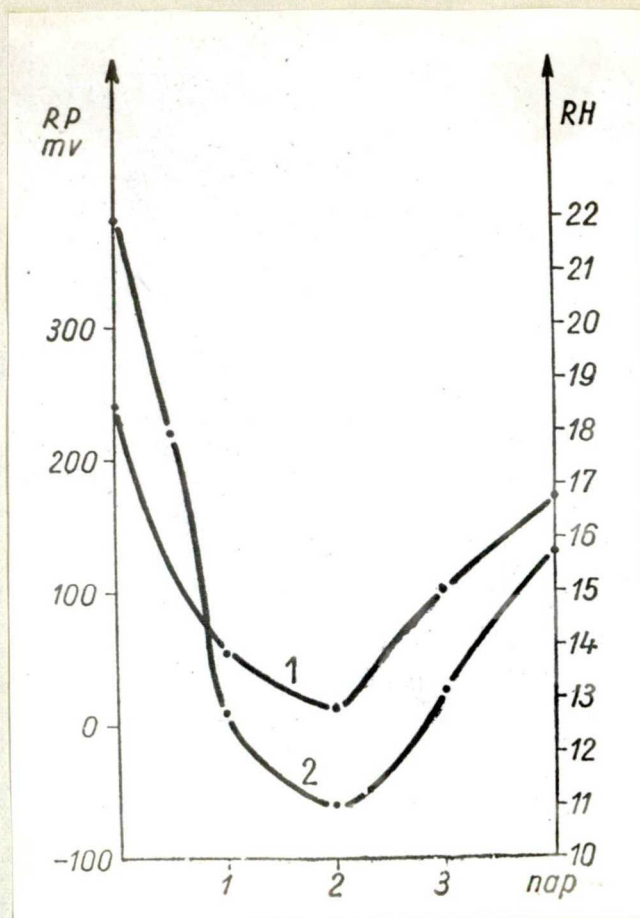
A szorbóz meghatározására Bertrand-féle módszert használtam ezzel a módosítással, hogy p. a. szorbózzal kalibrációs görbét készítettem és a  $\text{KMnO}_4$  fogyásból a szorbóz koncentrációt a görbéről olvastam le. A több lombikból vagy fermentorból álló sorozat méréséhez a már említett, elektromos meghajtású kommutátort használtam. /3. ábra./

Az első feladat az volt, hogy a rendelkezéseimre álló törzstenyészetnél megállapítsam azt, hogy mekkora a potenciál-ingadozás. Ettől függ u. i. a további vizsgálatok sikere. Ingarázógépen rázott törzseknél felvettem a potenciálgörbét és azt találtam, hogy a potenciálesés meghaladja a 200 mV-t /12. ábra/.

E megállapítás alapján végeztem a további kísérleteimet az intézetben bevált fermentáló lombikokban, amelyekben a tenyészet levegőzése már steril levegő átfúvatásával történik.

A kísérletek célja az volt, hogy megállapítsuk a tenyészet potenciálgörbéjének alakját. A potenciálgörbe alakjából u. i. következtetni lehet a tenyészet állapotára és meg lehet állapítani azt, hogy a tenyésztés melyik szakaszában alkal-





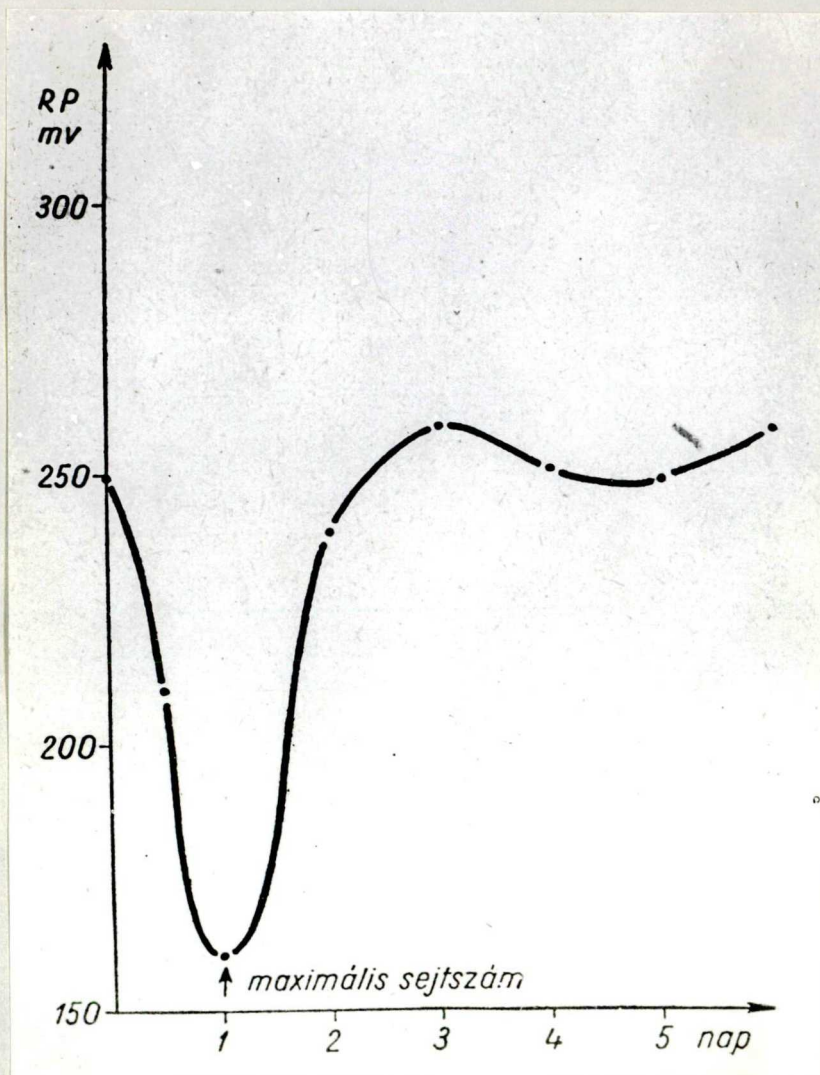
12. ábra.

Acetobacter Suboxydans rizott tenyésztésének RP /1/ és RH /2/ görbéje.

mas inokulum készítésére. A potenciálgörbe ez esetben is 200 mV-ot meghaladó különbséget mutat. /13. ábra/. A tenyésztés kezdetén gyakran mutatkozó rövid ideig tartó RP csökkenés onnan ered, hogy a tenyészet a táptalaj RP-ját a számára legmegfelelőbb értékre állítja be azáltal, hogy annak redoxkapacitását kimeríti. Így azonos táptalajban mérve a redoxpotenciált, az oltás alkalmával a legkülönbözőbb értékekből kiindulva végül is néhány óra múlva szo-



nos szintre áll be. A potenciálgörbe kezdetét tehát tulajdonképpen innen kell számítani.



13. ábra.

Acetobacter suboxydans redoxpotenciál görbéje levegőztetett lombikkultúrákban. Maximális sejtszám a potenciálmínimumon észlelhető.

A fermentáló lombikokban végzett kísérleteknél vizsgáltam azt is, hogy mikor éri el a tenyészet a maximális sejtszám-



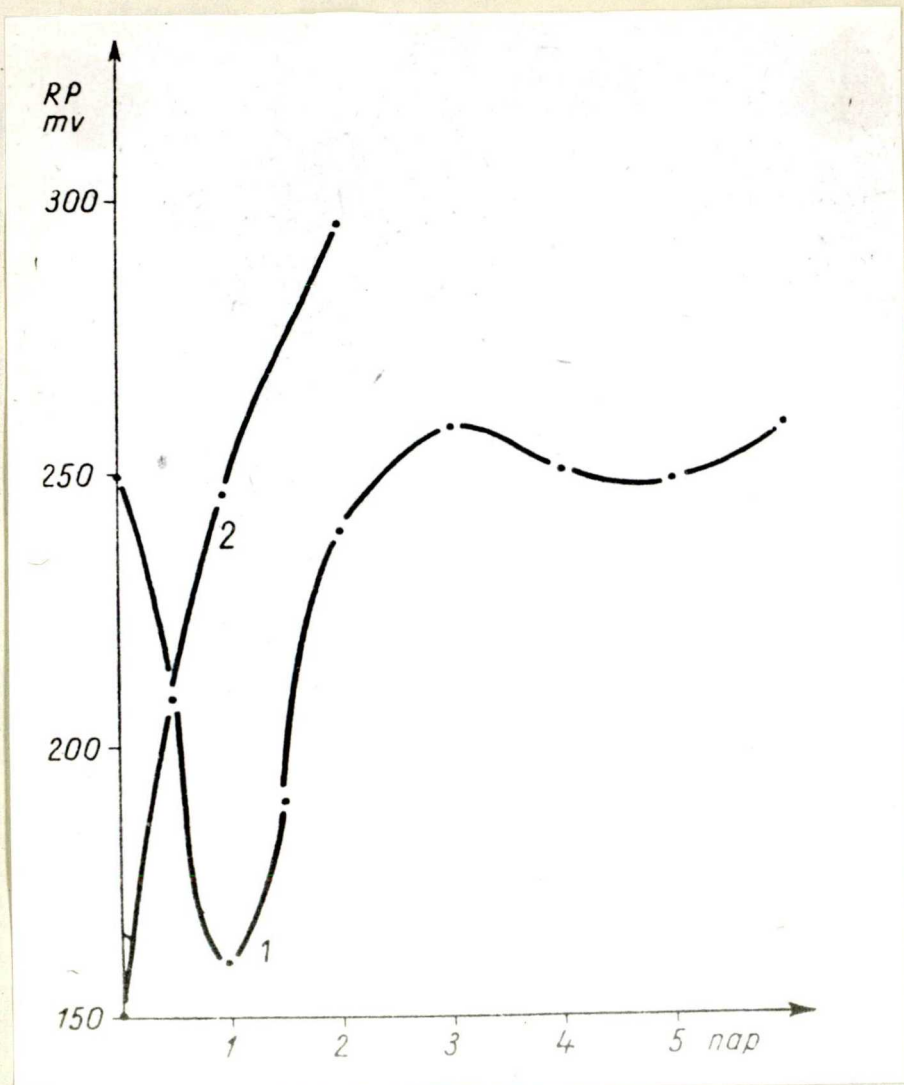
mot és azt találtam, hogy ez a potenciálminimumon észlelhető. Ebből az a következtetés vonható le, hogy levegőzött kultúrával történő oltás esetén, inokulum készítésre a tenyészet ezen szakaszán a legalkalmasabb. Tekintve, hogy a potenciálminimum aránylag rövid ideig tart, a fenti kérdés potenciál mérés alapján eldönthető.

A potenciálgörbe - korábbi tapasztalatokkal egybehangzóan - /6/ fertőzés esetén a szorbóztermelés esetében is mutatja a fertőzés időpontját. A görbe alakja aszerint változik, hogy a fertőzés az inkubáció elején, vagy pedig később következik be. Előbbi esetben a normális körülmények között észlelt potenciálesés elmarad és a görbe általában párhuzamos lesz az abscisszával. Későbbi fertőzés esetén a potenciál gyorsan emelkedik, majd ingadozó lesz /14. ábra/.

Annak eldöntésére, hogy a szorbóztermelés a redoxgörbe melyik szakaszára esik, az intézetünkben készült alumínium fermentorokban végeztem kísérleteket. Ezek kb. 20 liter űrtartalmu duplikátor edények voltak. A tenyésztés folyamán a szokásos módon mértem a redoxpotenciált, továbbá felvettem a cukorgörbét. Azt találtam, hogy a szorbózter-







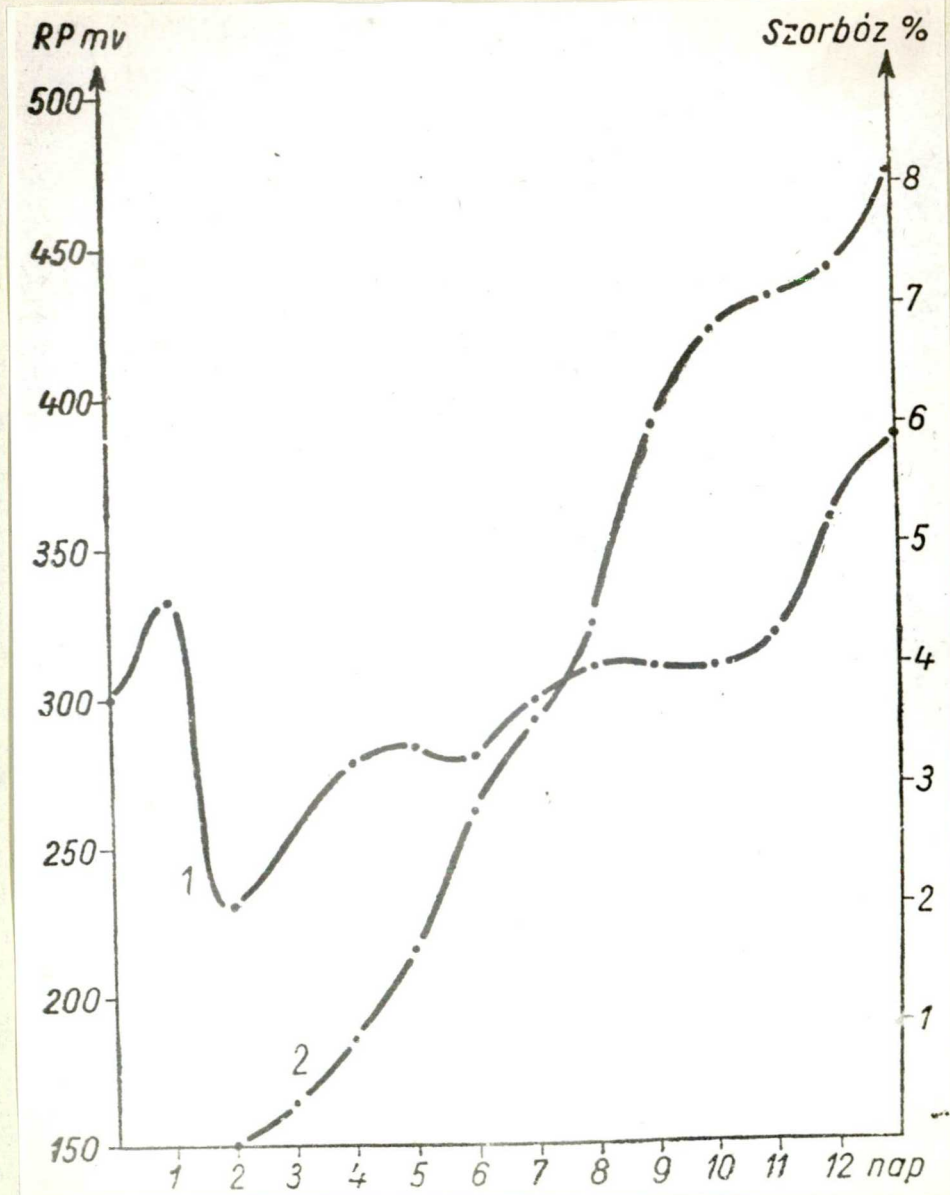
14. ábra.

Acetobacter Suboxydans aluminium fermentorban készült normális /1/ és fertőzött /2/ tenyészeinek RP görbéje.

melés kezdete mindig egybeesik a potenciálmínimummal és a termelés pontosan egybeesik a redoxgörbe u.n. termelési szakaszával /15. ábra/.

Heg kell azonban jegyezni, hogy a szorbáttermelés a re-





15. ábra.

Acetobacter Suboxydans tenyészetek RP /1/ és cukor-  
görbéje /2/ aluminium fermentorban. A redoxgörbe  
kezdeti emelkedő szakaszán a sejtek a táptalaj re-  
doxkapacitását kimerítik. A szorbit oxidációja a  
potenciálmínimumon indul meg. A 10. napon bekövet-  
kező potenciálemelkedés az előregedett sejtek au-  
tolizisától ered. A szorbit oxidációja az autolízis  
alatt is folytatódik.

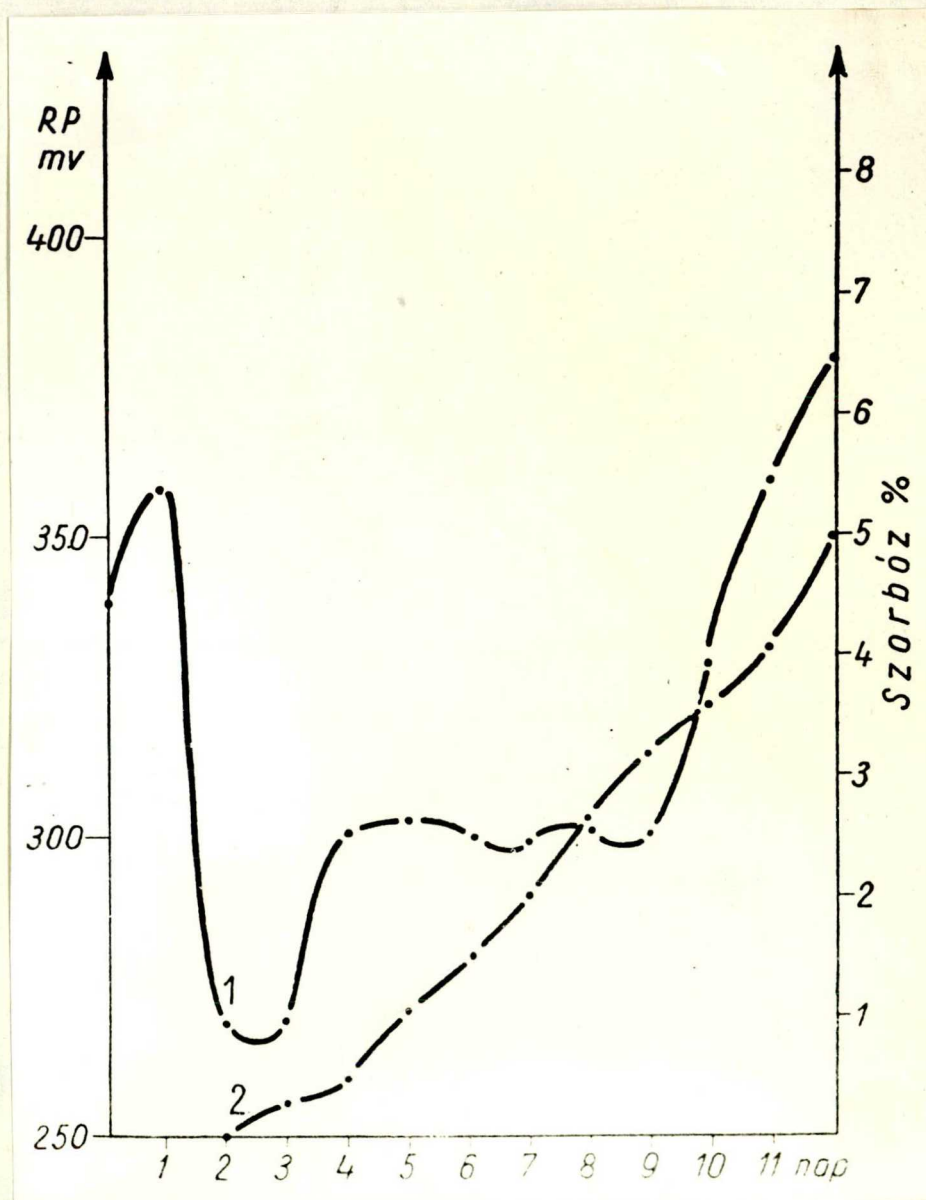


doxgörbe ellaposodásával egyidejűleg nem fejeződik be, hanem még egy ideig tovább tart és így a görbe alapján csak annyit lehet megállapítani, hogy mindaddig, amíg a redoxpotenciál emelkedik, felesleges cukormeghatározást végezni, mert a termelés befejezése a görbe lapos szakaszára esik. Azt is megfigyeltem, hogy a potenciálemelkedés mindig meghaladja a kezdeti potenciált. Tekintve, hogy a rendelkezésünkre bocsátott törzsből készült tenyészet pH-ja nagymértékben csökken, célszerű a redoxgörbét a pH figyelembevételével rH-ban kifejezni, bár az esetleges pH mérés hiányában készült potenciálgörbe az rH görbéhez hasonló lefutású. Alumínium fermentorban a potenciálesés szintén meghaladja a 200 mV-ot. Ha rH-ra számítjuk át az értékeket, kb. 8-10 rH a tenyésztés folyamán észlelhető különbség /15. ábra/.

Mivel a szorbóz fermentációja általában saválló berendezésben történik, alumínium fermentorainkhoz hasonló felépítésű, saválló acélból készült fermentorban is végeztem vizsgálatokat. Az eredmények ez esetben is általában ugyanolyanok voltak, mint az alumínium fermentorokban: a szorbóztermelés kezdete egybeesik a RP minimummal, majd pár-



huzamosan halad a potenciálgörbe emelkedő fázisával. A termelés befejezése itt is a redoxgörbe lapos részére, ill. az autolízis idejére esik, tehát itt is azt mondhatjuk, hogy a cukormeghatározást csak akkor érdemes végezni, amikor a RP már nem emelkedik /16. ábra/.



16. ábra.

Acetobacter Suboxydans tenyészetek RP /1/ és cukorgörbéje /2/ saválló acél fermentorban.



A RP és cukorgörbe egymáshoz való viszonyából az következik, hogy aerob körülmények között a szorbáttermelés akkor is folytatódik, amikor a sejtek előregedtek, ill. autolizáltak.

A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy:

1./ a különféle mikroorganizmusok antibiotikumokkal szemben tanúsított rezisztenciájának mérésére az elektrometriás módszer érzékenyebb, pontosabb és gyorsabb, mint az egyéb - csőhigitásos, vagy agar-diffúziós módszerek.

2./ A módszer nemcsak a rezisztencia eldöntésére alkalmas, hanem igen csekély mennyiségű antibiotikum kimutatására is, nem specifikus módon. A tenyészetbe adott antibiotikum ugyanis a sejtek enzimerendszerében a változások egész sorát indítja meg, amelyeket bár részleteiben megismerni nem tudunk, termodinamikailag azonban mégis követni tudjuk, mert a RP mérésekor nem a tenyészetbe vitt antibiotikum mennyiségét mérjük, hanem az általa elindított összes folyamatok révén beálló energiaváltozást.



3./ RP-méréssel az is kiszámítható, hogy sejtenként hány molekula antibiotikum szükséges a bakteriosztatikus hatás eléréséhez. Ilyen számítást penicillinnel szemben szenzitív törzsünkkel végeztem és azt találtam, hogy egy sejtre a szaporodás meggátlásához 700 - 800 penicillinmolekula esik. Miután e kísérletekben igen érzékeny módon kimutattam ezt a legkisebb penicillinmennyiséget, amely a sejtekhez kapcsolódva még bakteriosztatikus, ill. baktericid hatást mutat, a táptalajban a baktériumok sejtszámából ki tudtam számítani az egy sejt gátlásához szükséges penicillinmolekulák számát. U.i. 0,00025 E/ml a határkoncentráció, ez megfelel  $2,55 \cdot 10^{11}$  penicillinmolekulának, a baktériumok maximális sejtszáma ilyen koncentrációnál nefelometriáson mérve  $330 \cdot 10^6$ /ml, sejtenként a megkötött molekulák száma tehát 770. Más szerzők izotop vizsgálattal kapott eredményeivel ez a szám elég jól megegyezik /800 molekula/sejt/ /89/.

4./ A RP mérés, bár nem alkalmas a sejtekben végbemenő folyamatok részletes felderítésére, azonban a sejtekben végbemenő energiaváltozásról, amely jelzi a sejtek szaporodását, vagy pusztulását, minden időpillanatban fel-



világosítást nyújt, ennél is inkább, mert a mérési módszer tehetetlensége gyakorlatilag elenyésző.

5./ A rezisztencia éppen a mérési módszer csekély tehetetlensége folytán a legrövidebb idő alatt jelentkezik, ezért remélhető, hogy a módszer diagnosztikai célra is felhasználható, pl. Tbc. bacillusek rezisztenciájának mérésére.

6./ Ha összehasonlítjuk a különféle antibiotikumok hatására bekövetkező RP változást, azt látjuk, hogy a megváltozott RP görbe alakja az egyes antibiotikumok esetében más- és más.

7./ A baktériumok szaporodására jellemző RP görbe nemcsak in vitro jön létre, hanem pl. Bact. Coli-val fertőzött patkányokban szubkutan mérve, ugyancsak hasonló lefutású görbét kaphatunk.

8./ RP méréssel nemcsak a patogén baktériumok antibiotikum-rezisztenciája határozható meg, hanem maga az antibiotikumot termelő mikroorganizmus saját anyagcsere-terméké-



nek gátló hatása is. Ez a megfigyelés utmutatásul szolgál az ipari streptomicintermelés irányítására és műszaki feltételeinek biztosítására.

9./ A RP mérések eredményei ipari célra szolgáló fermentációknál is indikátorként használhatók

fertőzések kimutatására,

annak megállapítására, hogy a tenyészet inokulum számára mikor a legalkalmasabb,

a fermentáció kezdetén feleslegessé válik a szorbóztermelésnél pl. a cukormeghatározás mindaddig, amíg a redoxpotenciál a redoxgörbe második szakasza után állandóvá, ill. ingadozóvá nem válik.

Tekintettel arra, hogy fémfermentorokban is elég nagy potenciálkülönbségek alakulnak ki, nem szükséges  $rH$  értékben számolni és így a  $pH$  mérés, illetőleg a vele járó mintavétel is feleslegessé válik.

Az a körülmény, hogy a szorbóztermelés a sejtek előregedése után folytatódik, indokoltá teszi olyan kísérlet megindítását, amely a szorbóznak enzimpreparátummal való



termelésére irányul. Ugy látszik ugyanis, hogy a szorbit-  
nak szorbózzá való oxidálása a sejt morfológiai szerkeze-  
tétől független folyamat.

Dolgozatom befejezésével köszönetet mondok professzorom-  
nak, Dr. Kránci Andrásnak, hogy a témára figyelmemet fel-  
hívta, annak kidolgozását az Orvosi Vegytani és Biokémi-  
ai Intézetben lehetővé tette és munkám közben tanácsaival  
állandóan támogatott.



I R O D A L O M :

1. A Hewitt: Oxidations-Reductions potentials in Bacterology and Biochemistry. Könyv.
2. Krámlí A., P. Pettkó E. és Kiss P.: Acta Microbiol. 2. 39-49. /1954/.
3. Krámlí A., Kovács E., Matkovics B., Natonek M., Pulay B. és Turay P.: Acta Biol. 5. 79-86. /1954./
4. Krámlí A.: Biol. Közl. 2. 7-21. /1954/.
5. Krámlí A., Lantos J. és Stur J.: Acta Biol. 4. 185-191. /1956/.
6. Krámlí A., Kovács E. és Matkovics B.: Acta Biol. 5. 213-214. /1954/.
7. Cooper P.D. és D. Rowley: Intern. Congr. Biochem. I.st. Congr. Cambridge Engl. 1949. 422.
8. Rowley, D. és P-D. Cooper, P.W. Robertson és E. Lester Smith: Bioch. J. 46. 157-161, 1950.
9. Seigneirin, R.: C. r. Soc. Biol. 143. 1215. 1949.
10. Luis, R.: Ann. Inst. Past. 85. 295, 1953.
11. Kenneth Mc Opillen: Biochem. et Biophys. Acta 7. 54. 1951.
12. Parvis, D.: Boll.ist. sierroterap. milan. 32. 282-97, 1953.



13. Brogmann, G.: Zentr. Bakt. Parasitenk. I. Abt., Orig. 157, 577-80, 1952.
14. Work, T.S. és E. Work: The basis of chemotherapy, 1948.
15. Gale, E.: II.nd Congr. Intern. Biochim. Chim. Biol. VI. Symposium sur le mode d'action des antibiotiques, Paris, 1952, 5-20.
16. Simmonds, S. és J. S. Pruton: Science. 111, 329-31, 1950.
17. Pratt, R. és J. Dufrenoy: Texas rep. Biol. & Med. 7, 2-180, 1949.
18. Beljensky, M.: Ann. inst. Past. 84, 402-9, 1953.
19. Gros, F., M. Beljensky, M. Macheboeuf: Compt. rend. 231, 184-86, 1950.
20. Abel, J.P., R. Vendrely és R. Tulanne: Compt.rend. 231, 458-60, 1950.
21. Park, J.T. és M.I. Johnson: J.Biol.Chem. 179, 585-92, 1949.
22. Raynaud, M., B. Nisman és G.N. Cohen: Ann. Inst. Past. 73, 1012-14, 1947.
23. Cohen, S.S.: J. Biol. Chem. 168, 511-26, 1947.
24. DiMarco, A. és G. B orretti: Enzymologia XXV, 141-42. 1950. 14.
25. Gros, F., M. Macheboeuf és S. Jeulin: Ann.Inst.Past. 75, 242-254. 1948.



26. Grés, F., M. Macheboeuf, B. Rybak és P. Lacaille: Ann. Inst. Past. 77, 246, 63, 1949.
27. Rybak P. és F. Gros: Experientia, 4, 396-98, 1948.
28. Owen, C.A., A.G. Karlson és B.A. Zeller: J. Bact. 62, 53-62, 1951.
29. Loo, Y.H., H.E. Carter, W. Kohn és B. Anderlik: Arch. Biochem. 26, 144-50, 1950.
30. Paine, T.F. és F. Lipmann: J. Bact. 58, 587, 1949.
31. Rhymer, I., G.I. Wallace, W.L. Byers és H.E. Carter: J. Biol. Chem. 169, 457, 58, 1947.
32. Michstein, H.C. és R.P. Gilfillan: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 77, 459, 61, 1951.
33. Oginsky, E.L.: F.H. Smith és W.W. Umbreit: J. Bact. 58, 747-59, 1949.
34. Umbreit, W.W.: J. Biol. chem. 177, 703-14, 1949.
35. Umbreit W.W.: Ann. New York Acad. Sc. 53, 6-12, 1950.
36. Umbreit W.W. és E.L. Oginsky: J. Mt. Sinai Hosp. 19, 175-84, /1952/.
37. Ernest, A.S.: Bull. Int. Marine and Trop. Med., Med. Acad. Gdansk, Poland 2, 185-204, 1949.
38. Barkulis, I.L.: J. Bact. 65, 337-343, 1953.
39. Agnew, S. etc.: Proc. Soc. exptl. Biol. & Med. 65, 38-41, 1947.



40. Umbreit, W.W.: Symposium on Mode of Action of Antibiotics 2-nd Int. Congr. Biochem., Paris, 63-77./1952./
41. Barkulis, I.L.: J. Bact. 61, 375, /1951./
42. Oginsky, B.L., P.H. Smith és W.W. Umbreit: J. Bact. 58, 747-59, /1949./
43. Mayer, H.M., Croft, C.C. és Gray. H.M.: J. Exptl. Med.: 88., 427, 44, /1948./
44. Umbreit, W.W. és N.E. Tonhazy: J. Bact. 58, 769, 776, /1949./
45. Marshall, E.K.: J. Pharmacol. & Exper. Therap., 92, 43-48, /1948./
46. Moliton, H. és O.E. Graessle: J. Pharmacol. & Exper. Therap., 98, Part II. 1-60. /1950./
47. Nelson, W.B. J. Forgács és J.L. Kucera: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 64., 20-21, /1947./
48. Ingrao, F. és L. Vella: Ann. ist. "Carlo Forlanini" 12, 177-181.
49. Eiichi Sakakibara: Acta Schol. Med. Univ. Kioto, 29, Nr. 1, 67-71, /1951./
50. Marmur J. Saz A.K.: Antibiotics & Chemotherapy 3, 613-617, /1953./
51. Wong D.T.O., Stanley, B. and Aje, S.: Antibiotics & Chemotherapy 3., 607-12, /1953./



52. Pratt, R. and Dufrenoy, J.: Rev. Path. Comparée et Hyg. Gen. 50, 864, /1950./
53. Brody, T.M. and Bain, J.A.: J. Pharmacol. & Therap, 103, 338, /1951./
54. Loomis, W.F.: Science, 111, 474, /1950./
55. Van Meter, J.C. and Oleson, J.J.: Science, 113, 273, /1951./
56. Gale, E.F.: Symposium on Mode of Action of Antibiotics, 2-nd Int. Congr. Biochem., Paris, 5-20, /1952./
57. Chandler, C.A. and v. der Goltz, E.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 91, 475-79. /1952./
58. Smith, G.N., Worrel, C.S. and Swanson, A.L.: J. Bact. 58, 803-809, /1949./
59. Bergmann, E.O. and Sicher, S.: Nature, 170, 931, /1952./
60. Váci, L. és Mihályfi: Orvosi Hetilap 94, 1097-1101, /1953./
61. Smith, P-H., E.L. Oginsky és W.W. Umbreit: J. Bact. 58, 761, /1949./
62. Gauze, G.F.: Leckiji po Antibiotikam, Moskva, /1949./
63. Raimondo di Fr.: Boll. ist. sierroterap. milan. 28, 239-43, /1949./
64. Raimondo di Fr. és N. Mannino: uyanott, 32, 45-51, /1953./



65. Haas, L.F. és O. Wyss: J. Bacteriol. 65, 354, /1953./
66. Yukio Yamamoto: Igaku to Seibutsugaku, 21, 17-19, /1951./
67. Cannella, A.: Giorn. Batteriol. Immunol. 45, 231-34, /1953./
68. Hatchkiss, R.D.: 2-nd Congr. Intern. Biochim. Chim. biol. VI. Symposium sur le mode d'action des antibiotiques, Paris, /1952./ 5-20.
69. Alexander, H.E. és G. Leydi: J. Exptl. Med., 97, 17-31, /1953./
70. Lund, B.: Acta Pathol. Microbiol. Scand. 33, 171, /1953./
71. Espensen, Einar: Acta Pathol. Microbiol. Scand. 29, 210, /1951./
72. Walter, A.M.: Verhdl. dtach. Ges. inn. Med. 58, 104-107, /1952./
73. Glazsen, M.G.: Zsurnal Micr. Epid.i. Immunbiol./1953./2.
74. Kaneo Ishii: Igaku to Seibutsugaku, 21, 120-123, /1951./
75. Tomoichiro Akiba és Kaneo Ishii: Japan.J. Exptl. Med. 22, 241-47.
76. Uesaka, I. és H. Oiwa: Arch. Antibiotics /Japan/ 2, 419-424, /1949./
77. Nakatsuka, M. és M. Toyota: Arch. Antibiotics /Japan/ 3, 217-218, /1951./



78. Beljensky, M.: Ann. Inst. Past.: 83, 80-101, /1952./
79. Pollack, M.R. és A. Torriani: Compt. rend. 237, 276.  
/1953./
80. Chandler, C.A. és E.v.d. Goltz: Bull. Johns Hopkins  
Hosp. 91, 475-79, /1952./
81. Chabbert, Y.: Ann. Inst. Past. 80, 627-632. /1951./
82. Eagle, H.: J. Bact. 63, 623-638. /1952./
83. Fűrész I., Kubinyi Jánosné és Kós R.: Orv. Hetilap  
1954. jan. 3. 7. ad.
84. Schlipkötter, H.W.: Dtsch. Med. Wochf. 77, 1952. 2.  
Halbjahr.
85. Klein, S.: Dtsch. Med. Wochr. 78, 12-30, /1953./
86. Hewitt, L.P.: Biochem. Jour. 24, 676-681, /1930./
87. Drouhet, E.: Ann. Inst. Past. 76, 168-173, /1949./
88. Drouhet, E. és A. Képes: Ann. Inst. Past. 76, 173-  
177, /1949./
89. Kovács E. és Matkovic B.: Kísérletes Orvostudomány.  
Sajtó alatt.

