

## VPLYV ZNÍŽENEJ INKUBAČNEJ TEPLOTY NA SYNTÉZU NUKLEOVÝCH KYSELÍN A BIELKOVINY U MEZOFILNÝCH A PSYCHROFILNÝCH BAKTÉRIÍ

J. ARPAI, Z. LEŠKOVÁ, D. LONGAUEROVÁ

*Mikrobiologické odd. Výskumného ústavu pre konzerváciu potravín Bratislava.*

O tej doby ako Brachet (1947) prvýkrát uverejnil sledovanie závislosti vzťahov medzi biosyntézou kyseliny ribonukleovej (RNK), kyseliny dezoxyribonukleovej (DNK) a proteosyntézou mikrobiálnej bunky, sa tejto problematike venovalo mnoho prác. Málktoré z nich sa však zamerali na štúdium vplyvu inkubačnej teploty, ak odhladneme od tých prác, ktoré sa zaoberali synchronizáciou rastu bakteriálnej kultúry (Burns, 1962). Zdá sa, že najmenej prebádané je pôsobenie suboptimálnych inkubačných teplôt, ktorým sa pripisovali buď veľmi rôznorodé účinky (Wellerson a Tetrault, 1955, Jevreinová a i. 1959, 1930, 1931), alebo aj žiadne (Hagen a Rose, 1962). Za tohto stavu sme pristúpili k pokusom, so zameraním zistiť do akej miery vplýva špecifickým spôsobom zníženie teploty na metabolizmus nukleových kyselín u vybraného druhu mezofilnej a psychrofilnej baktérie. Tu uvádzame prvú časť týchto prác.

### Materiál a metódy

**Mikroorganizmy.** Na sledovanie sa vybrali tie isté kmene *Escherichia coli* B a *Pseudomonas fluorescens* ako k predchádzajúcim prácam (Arpai, 1931, 1962, 1963). Uchovávali sa v lyofilizovanom stave.

**Príprava bakteriálnej suspenzie a kultivácia.** K príprave inokula slúžil bunkový materiál, ktorý sa suspendoval do takého množstva 0,9 %-ného roztoku kuchynskej soli, aby jeho optická hustota meraná za štandardných podmienok na Zeissovom spektrofotometri pri 644 m $\mu$ , zodpovedala konštantnému počtu živých buniek ( $10^{10}$  na ml) stanovenému počítaním na platniach. Z tejto suspenzie sa bralo 10 ml ako inokulum na 1000 ml základnej pôdy naplnenej do dvojlitrovej Erlenmeyerovej banky upravenej na prevzdušňovanie. Zloženie kultivačnej pôdy na báze trypticky natráveného bujónu bolo rovnaké ako v predošlých prácach (Arpai, 1961, 1963). Rýchlosť rastu sa sledovala pri dvanástich teplotách ležiacich v rozpätí od 40 °C do 14 °C u *Escherichia coli*, resp. v rozpätí od 30 °C do 2 °C pre *Pseudomonas fluorescens*. Kultivácia sa diala za intenzívneho prevzdušňovania prebublávaním v termostatoch (350 ml vzduchu na 1 liter pôdy za min.) a kryostatoch po taký čas, kým rast kultúry nedospel do stacionárnej fázy.

Sledovanie rýchlosti rastu. Metódy nefelometrického sledovania rastu a výpočtu generačnej doby sa už tiež uviedli v našich vyššie citovaných prácach. Špecifická rastová konštanta  $k$  (v  $\text{hod.}^{-1}$ ) sa vypočítala podľa vzorca

$$k = \frac{dX}{Xdt} = \frac{2.303 (\log_{10} X_2 - \log_{10} X_1)}{t_2 - t_1}$$

kde  $X_1$  a  $X_2$  znamenajú optickú hustotu kultúry, resp. počet buniek v čase  $t_1$  a  $t_2$ . Dĺžka lag fázy sa prepočítala podľa Squiresa a Hartsella (1955).

Chemické stanovenia. Vzorky kultúry sa odobrali v takých časových intervaloch, aby tieto trvali približne po dobu presahujúcu jednu generáciu, nie však jej dvojnásobok. To znamená, že z kultúry *Escherichia coli* sa pri 38 °C odoberali vzorky po každej hodine, pri 25 °C každé 2 hodiny, pri 15 °C každých 12 hodín, kým z kultúry *Pseudomonas fluorescens* sa pri 27 °C vzorkovalo po 1 hodine, pri 15 °C po 3 hodinách a pri 2 °C po 20 hodinách. Vzorky bunkového materiálu sa odstreďovali za chladu a resuspendovali do takého druhu média, aby zodpovedalo metodickým požiadavkám na stanovenie DNK a RNK podľa Ogura a Rosenovej (1950) a bielkoviny podľa Lowryho a i. (1951). Štandardná RNK sa pripravila z kvasníc podľa metódy Fischera (1960). DNK získaná z telacej dojčenskej žľazy (týmu) bola prečistená na 8,1 % obsahu fosforu pri pomere P/N = 0,62. Za tento štandard ďakujeme dr. J. Pechaňovi z Katedry biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave.

Teplotný koeficient ( $Q_{10}$ ) sledovaných metabolických procesov sa vypočítal v rozmedzí zvolených teplôt v návaznosti na prácu Ingrahama a Baileya (1959).

Štatistické vyhodnotenie výsledkov pokusov, ktoré sa robili najmenej v dvoch opakovaniach, sa robilo Studentovým t-testom a stanovením významnosti rozdielov regresných vzťahov podľa návodu Weberovej (1957).

## Výsledky

Úvodom k vlastnej práci sa stanovovali zmeny rýchlosti rastu sledovaných bakteriálnych kultúr v závislosti od inkubačnej teploty postupne znižovanej z oblasti optima k suboptimálnym až minimálnym teplotám. Výsledky týchto pokusov vyjadrené dĺžkou generačnej doby a prepočítané na špecifickú konštantu rastu, sú vyčíslené v tabuľke 1. Na tomto základe sa zvolili tri teploty, pri ktorých sa priebehom ďalšej práce sledovala biosyntéza nukleových kyselín a bielkoviny v bunke. Jedna zo zvolených teplôt bola optimálna, pri druhej bola rýchlosť rastu výrazne, t. j. až na štvrtinu znížená, tretia ležala tak nízko, že pri nej generačná doba trvala vyše desaťnásobne ako za optima.

Súhrn výsledkov sledovania syntézy RNK, DNK a bielkoviny počas rastu baktérii pri zvolených teplotách je — v hodnotách vzťahovaných na jednu bunku — uvedený v tabuľke 2. Tam sú vyčíslené aj vzájomné vzťahy medzi sledovanými bunkovými komponentami. Základnú charakteristiku študovanej biosyntézy za teplotného optima podáva pre *Escherichia coli* graf na obraze 1. Z neho vidieť priebeh biosyntézy, ktorý je typický tým, že k najväčšiemu prírastku množstva nukleových kyselín dochádza v čase pred započatím rozmnožovania buniek, kým najvyššiu hladinu dosahuje obsah RNK a DNK na začiatku rozmnožovania. V ex-

Tabuľka 1. Generačné doby v exponenciálnej fáze rastu mezofilnej kultúry E-coli a psychofilnej kultúry Ps. fluorescens v prevzdušnenej pôde

Escherichia coli	Teplota °C	40	39	38	37	36	25	24	23	22	21	15	14
	Generačná doba min.	25	24	24	24	26	90	93	97	102	190	330	450
	k min <sup>-1</sup>	0,0277	0,0289	0,0289 100 %	0,0289	0,0267	0,0078	0,00746	0,00715	0,0068	0,00365	0,00187	0,00152
Pseudomonas fluorescens	Teplota °C	30	29	28	27	26	15	14	13	12	11	3	2
	Generačná doba min.	51	50	48	47	49	110	140	148	160	170	490	560
	k min <sup>-1</sup>	0,0136	0,0137	0,0144	0,0147 100 %	0,0141	0,00631	0,00495	0,00468	0,00453 29,2 %	0,00408	0,00141	0,00123

V krúžku: teploty zvolené k ďalšiemu sledovaniu biosyntetických procesov.

Tab. 2. Množstvá RNK, DNK a bielkoviny, s hodnotou variačného koeficientu meraní ako aj ich vzájomné pomery počítané na bunku *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens* v jednotlivých rastových fázach v závislosti od inkubačnej teploty

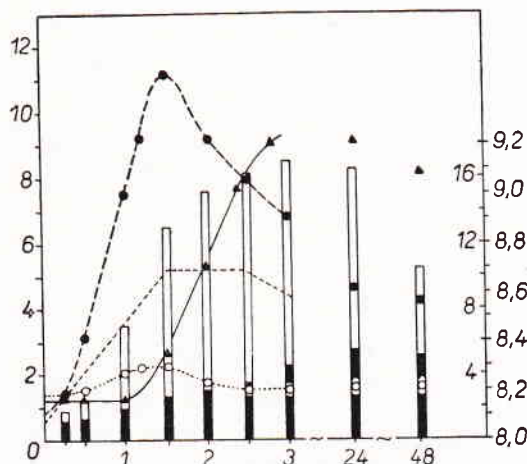
Rastová fáza	Organizmus	kultiv. teplota v °C	RNK g.10 <sup>-14</sup> /bunka	DNK g.10 <sup>-14</sup> /bunka	Bielkovina g.10 <sup>-14</sup> /bunka	DNK/RNK	Bielkovina /RNK	Bielkovina /DNK
lag	<i>Escherichia coli</i>	38	(0,81±0,039) 7 52±0,042	(1,42±0,023) 2 12±0,035	(4,8±0,025) 25 4±0,041	(1,75) 0,230	(5,9) 3,4	(3,37) 12,0
		25	7,84±0,064	2 18±0,048	25,0±0,059	0 278	3 2	11,4
		15	8 35±0 051	2 25±0,061	24,5±0 024	0,269	2,9	10,8
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	(2,24±0,026) 8,15±0 033	(1,38±0 034) 2 25±0,060	(5 2±0,023) 25 1±0 031	(0,616) 0,275	(2,32) 3,2	(3,71) 11,6
		12	8,12±0,062	2,33±0 070	26 2±0,019	0 287	3 2	11,2
		2	8,80±0 044	2 35±0,047	25 8±0 022	0 277	2,9	11,0
zrýchlená*	<i>Escherichia coli</i>	38	11 23±0,021	2,31±0,029	41 6±0,013	0,233	3,7	18,0
		25	12 56±0,054	2,33±0,058	35 3±0,018	0 185	2 8	15,1
		15	13 18±0 037	2 38±0,040	29,5±0 018	0 180	2 2	12,4
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	13 35±0,035	2 45±0 041	38 0±0,024	0,183	2 8	15,5
		12	13,50±0 038	2 45±0,041	38,2±0 026	0,181	2 8	15 6
		2	13 90±0,019	2 49±0 026	37,5±0,011	0 179	2,7	14,9
exponenciálna**	<i>Escherichia coli</i>	38	9,21±0 052	1,83±0,053	38 2±0 030	0,198	4 14	20,8
		25	9 20±0,066	1 84±0 064	35,5±0,042	0 211	3 86	19 3
		15	9,95±0 072	1,90±0,063	27,5±0 045	0 191	2 76	14,4
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	10,05±0 046	2 30±0,048	36 1±0,033	0 229	3 43	15,7
		12	10 85±0,037	2,30±0 033	36,0±0,018	0 223	3,22	15 6
		2	12 58±0,023	2 40±0,025	36 1±0 012	0,190	2 86	15,0
stacionárna**	<i>Escherichia coli</i>	38	4 85±0,067	1 58±0,063	34 2±0,048	0,323	7,02	21 6
		25	4 94±0 055	1 60±0,055	32 5±0 037	0 304	6 58	21 6
		15	5 25±0 050	1 75±0 051	27,8±0,026	0,337	5 32	15,8
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	7 08±0 084	2 23±0,073	36,0±0 059	0 316	5 04	16 1
		12	7 65±0,045	2 27±0 044	35 8±0,022	0,294	4,68	15,7
		2	7 96±0,031	2 29±0,035	35 7±0 016	0 287	4 47	15 6

V zátvorkách = počiatočné hodnoty

\*) najvyššie hodnoty

\*\*\*) stredné hodnoty

ponenciálnej fáze rastu klesá obsah nukleových kyselín v bunke a tento pokles pokračuje aj v záverečných fázach rastu. V stacionárnej fáze býva v bunke spravidla menej ako 2/5 obsahu RNK v začiatkovej fáze zrýchlenia rastu. Obsah DNK klesá stárnutím bunky pozvoľnejšie a činí v stacionárnej fáze ešte viac ako 3/5 maximálneho množstva. Následkom toho sa mení aj pomer RNK : DNK v bunke, ktorý pri mladej kultúre možno vyčíslit ako 5 : 1, a starnutím však poklesne až na 3 : 1. V bunkách so spomaleným, resp. zastaveným metabolizmom po lyofili-



Obraz 1. Syntéza nukleových kyselín a bielkoviny pri raste *Escherichia coli* za optimálnej teploty vyjadrená absolútnym obsahom RNK na bunku (● — ●), DNK na bunku (○ — ○), ich vzájomným pomerom (— — —), relatívnym vzostupom množstva RNK v ml kultúry (prázdné stĺpce) a množstva DNK v ml kultúry (čierne stĺpce): Rastová krivka je vyznačená nerušovanou čiarou (▲ — ▲). Na osi poradnic vľavo: stupnica pre absolútny obsah RNK a DNK v bunke v g · 10<sup>-14</sup> a pre ich vzájomný pomer. Na osi poradnic vpravo na vnútornej strane: stupnica pre relatívny vzostup množstva nukleových kyselín v ml kultúry; na vonkajšej strane stupnica k rastovej krivke vyjadrujúca log počtu buniek na ml. Na osi úsečiek čas rastu v hodinách.

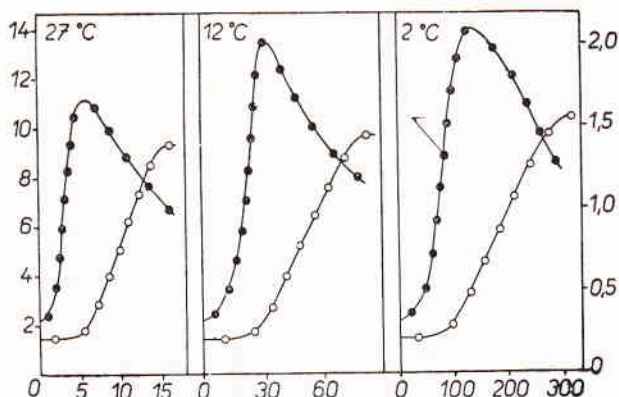
značnom zásahu, ďalej poklesol obsah RNK v bunke a tak v nemetabolizujúcich bunkách, z ktorých sa pripravilo inokulum, sa našlo len  $0,8 \times 10^{-14}$  g RNK, pri  $1,4 \times 10^{-14}$  g DNK. Zodpovedá to zvrátenému pomeru 1 : 1,75, ktorý je síce nezvyklý, avšak v súlade s nálezom Morseho a Cartera (1949). Z výsledkov sledovania pri teplotnom optime vyplýva aj známa korelácia medzi proteosyntézou a nukleovými kyselinami. Graf na obraze 1 ukazuje, že množstvá nukleových kyselín a bielkoviny rastú v objemovej jednotke kultúry skoro súbežne. Konštantný vzťah sledovaných zložiek sa narúša tým, že pokračujúcim rastom sa syntéza RNK viac spomaľuje ako proteosyntéza.

Obdobné sledovanie makromolekulárnej syntézy u psychrofilnej kultúry *Pseudomonas fluorescens* pri teplotnom optime prinieslo odlišné výsledky v tom, že vo východiskovom bunkovom materiáli inokula bol obsah RNK relatívne vyšší ako DNK a absolútne vyšší ako v bunkách *Escherichia coli*. Táto zvýšená hladina počiatkovej RNK v bunke mala za následok, že bunky *Pseudomonas fluorescens* obsahovali aj počas rastu pomerne vyššie množstvo RNK i keď jej kvóta prí-



rastku v priebehu exponenciálnej fázy nebola signifikantne vyššia ako u *Escherichia coli*. Príslušné číselné údaje a tom sú zostavené do tabuľky 2 a do prvého grafu na obraze 2.

V lag fáze, ktorá sa znížením inkubačnej teploty proporciálne predlžuje, sa zistila u *Escherichia coli* istá atypičnosť priebehu syntézy DNK. Vyznačovala sa tým, že ku koncu druhej tretiny lag fázy sa zastavil prírastok DNK, ktorej hladina zotrvala až do započatia delenia na konštantnej výške. Syntéza RNK sa



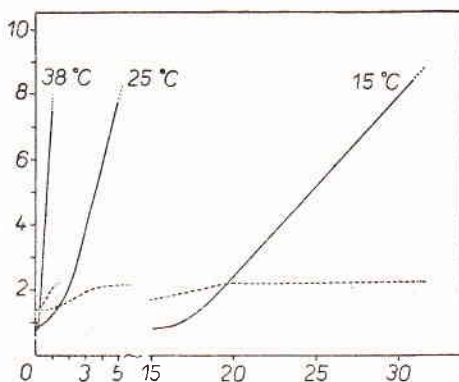
Obraz 2. Vplyv inkubačnej teploty u *Pseudomonas fluorescens* na syntézu RNK vyjadrenej množstvom na bunku (●—●), priebehom rastu vyznačeného krivkou ○—○. Na osi poradnic vľavo: množstvo RNK v  $\text{g} \cdot 10^{-14}$ ; vpravo: optická hustota v hodnotách extinkcie. Na osi úsečík: čas rastu v hodinách.

však následkom zníženej teploty čo do priebehu nemenila, t. j. mala typickú exponenciálne stúpajúcu tendenciu a líšila sa od štandardného priebehu za teplotného optima len svojou kinetikou. Príslušný teplotný koeficient v rozpätí od 38 do 25 °C mal pre RNK hodnoty okolo 3,3, kým  $Q_{10}$  pre DNK mal hodnotu pri 2,3. Podobný rozdiel bol aj medzi zmenou rýchlosti biosyntézy pri znížení teploty z 25 °C na 15 °C, ktorého  $Q_{10}$  pre RNK zodpovedal hodnote 3,8 oproti 2,5 pre DNK. Výsledky sledovania priebehu syntézy RNK a DNK počas lag fázy kultúry *Escherichia coli* inkubovanej pri troch zvolených teplotách sa nachádzajú tiež v tabuľke 2 a sú graficky znázornené na obraze 3.

U kultúry *Pseudomonas fluorescens* sa v lag fáze nezistili z hľadiska zmien kinetiky syntézy nukleových kyselín významné rozdiely pri znížení inkubačnej teploty z optima na 12 °C. To znamená, že teplotné koeficienty biosyntézy RNK a DNK mali len bezvýznamne rozdielne hodnoty, ktoré ležali v úzkom rozptyle okolo 1,9. V teplotnom rozmedzí od 12 do 2 °C bol príslušný rozdiel pre  $Q_{10}$  len veľmi slabo signifikantný, t. j. pre RNK mal  $Q_{10}$  priemernú hodnotu 2,23 oproti 2,21 pre DNK. Z týchto ukazovateľov vyplýva, že pri sledovaných suboptimálnych teplotách nedošlo u psychrofilného kmeňa *Pseudomonas fluorescens* počas lag fázy k tak výraznej disproporcii medzi priebehom syntézy RNK a DNK ako u *Escherichia coli*.

Fáza zrýchleného rastu bola zaujímavá tým, že sa v nej výrazne prejavil vplyv zníženia inkubačnej teploty na zvýšenie obsahu nukleových kyselín v bunke.

To znamená, že napriek spomalenej rýchlosti syntézy nukleových kyselín bola ich maximálna hladina vyššia ako za optimálnej teploty, čo umožnilo dlhšie trvanie rastovej fázy. U *Escherichia coli* bolo toto pomerné zvýšenie, s prihliadnutím na rozptyl výsledkov pri štandardnej kultivácii, v niektorých prípadoch štatisticky významné; tvorilo u RNK pri inkubačnej teplote 25 °C na konci lagu 4,2 % (nesignifikantné) a dosiahlo vo fáze zrýchleného rastu až 11,8 % (veľmi signifikantné). Pri 15 °C bol obsah RNK na konci lagu o 11 %, a v maxime až o 17,4 % vyšší



Obráz 3. Vplyv inkubačnej teploty na syntézu nukleových kyselín počas lag fázy buniiek *Escherichia coli*. Obsah RNK vyznačený plnou čiarou, obsah DNK v bunke vyznačený prerušovanou čiarou. Na osi poradnic: množstvo nukleových kyselín v g · 10<sup>-14</sup>. Na osi úsečiek: čas v hodinách.

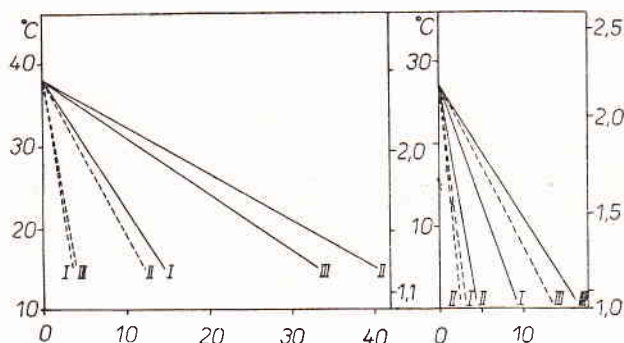
(v oboch prípadoch veľmi signifikantné). Množstvo DNK vzrástlo pri 25 °C do konca lagu o 2,8 % (nesignifikantné), resp. pri 15 °C o 6,1 % (slabo signifikantné); vo fáze zrýchleného rastu však činil príslušný vzostup už len 0,8 %, resp. 3 % (nesignifikantné). Uvedené zvýšenie obsahu nukleových kyselín v bunkách nesprievádzala zvýšená proteosyntéza. Naopak, množstvo bielkoviny v bunkách *Escherichia coli* sa pri znížení inkubačnej teploty zmenšilo. V lag fáze bolo to nepatrné a činilo pri 25 °C v priemere 1,6 % a pri 15 °C v priemere 4,2 %; vo fáze zrýchleného rastu bol však pokles výrazný, t. j. pri 25 °C činil 15,1 % a pri 15 °C až 29,2 %.

Nerovnaký vplyv zmien teploty na sledovanie biosyntézy u *Escherichia coli* ukazujú regresné priamky na prvom grafe obrazu 4. Z nich vidieť, že podiel RNK v pomere k obsahu DNK a bielkoviny v bunke stúpa proporcionálne k poklesu inkubačnej teploty, resp. k dĺžke generačnej doby vyjadrenej jej logaritmom. Pokles inkubačnej teploty sa najsilnejšie prejavil na znížení hodnoty pomeru DNK : RNK, resp. bielkovina : RNK vo fáze zrýchleného rastu.

U *Pseudomonas fluorescens* vyvolali suboptimálne inkubačné teploty za lag fázy menej významné a vo fáze zrýchlenia rastu len veľmi malé zvyšovanie obsahu nukleových kyselín. Pri znížení teploty na 12 °C sa v lag fáze nezistili žiadne zmeny na obsahu RNK v bunkách a vo fáze zrýchlenia len 1,2 %-ný prírastok; pri 2 °C sa nameral v lagu 8 %-ný a na počiatku rastu 4,1 %-ný vzostup. Množstvo DNK sa súbežne zvýšilo pri 12 °C v rozpätí od 0 do 3,5 % a pri 2 °C od 1,6 do 3,5 %. Tieto zmeny v množstvách syntetizovanej RNK, DNK a bielkoviny sú opäť graficky

vyjadrené presunom ich vzájomných vzťahov v závislosti od teploty, resp. od generačnej doby alebo špecifickej rastovej konštanty, na obraze 4. V porovnaní k mezofilnej kultúre *Escherichia coli* je u psychrofila vplyv zníženej teploty podstatne menší a prejavuje sa pomerne najvýznamnejšie v exponenciálnej fáze rastu.

Za exponenciálnej fázy rastu platí u *Escherichia coli*, že množstvo novosyntetizovaných nukleových kyselín, predovšetkým RNK, vyprodukované za generačnú dobu je v nepriamom pomere k jej dĺžke trvania, resp. k inkubačnej teplote,



Obraz 4. Percentuálny pokles hodnoty pomeru DNK : RNK (prerušované čiary) a bielkoviny : RNK (plné čiary) v rôznych fázach rastu (I = lag, II = zrýchlenie, III = exponenciálna fáza) u *Escherichia coli* (na obraze vľavo) a u *Pseudomonas fluorescens* (na obraze vpravo) v závislosti od inkubačnej teploty resp. rýchlostnej konštanty rastu ( $k$ ) znázornený regresnými priamkami. Na osi poradnic vľavo: teplota v °C, vpravo:  $\log k \cdot 10^4$ . Na osi úsečiek: percentuálna stupnica.

ako na to prví poukázali Malmgren a Hedén (1947). Naše výsledky sú v zásadnom súlade s týmto poznatkom, avšak modifikované tým, že keď následkom suboptimálnych inkubačných teplôt sa zásoby nukleových kyselín v bunke pred započatím rozmnožovania výrazne zvýšili, ostala ich hladina aj v priebehu logaritmického rastu vyššia a to aj napriek tomu, že priebežný prírastok nukleových kyselín poklesol. Tak tomu bolo za kultivácie pri 15 °C. Pokusné údaje sú vyčíslené v tabuľke 2 a teplotný gradient zmien vo vzťahoch makromolekulárnych bunkových zložiek na obraze 4.

U *Pseudomonas fluorescens* došlo v exponenciálnej fáze rastu následkom ochladenia len k menším presunom v biosyntetických procesoch. Pri porovnávaní s výsledkami sledovania u kultúry *Escherichia coli* sú nápadné rozdiely v tom, že psychrofilné baktérie rastúce za chladu majú nezmenený obsah bielkoviny, ba maximálna koncentrácia bielkoviny v kultúre je pri nižšej inkubačnej teplote vyššia ako pri optime z hľadiska rýchlosti rastu. Príslušné výsledky sú zostavené do tabuľky 2 a v grafoch na obrazoch 3 a 4.

Stacionárna rastová fáza ako aj ukončenie rastového cyklu je vyznačené znížením obsahu nukleových kyselín i bielkoviny v bunke. Pri tom sa ukázalo, že čím je inkubačná teplota nižšia, tým je tento prejav starnutia bunky pozvoľnejší, ako o tom svedčia číselné údaje v tabuľke 2.



Keď sa hľadá vysvetlenie pre zvýšenie obsahu nukleových kyselín v bunkách rastúcich pri suboptimálnych teplotách, možno vychádzať z ich vzťahu k aktívnej zložke enzýmov zúčastnených medzi inými aj na proteosyntéze. Dá sa totiž predpokladať, že keď následkom poklesu teploty sa zníži číslo premeny enzýmovej molekuly, dochádza ku kompenzácii aktivity zvýšenou syntézou nukleových kyselín ako enzýmotvorných systémov. Obdobne sa vysvetľovalo zvýšením enzymatickej aktivity, že *Bacillus licheniformis* obsahoval menej nukleových kyselín, keď sa inkuboval pri 58 °C než za kultivácie pri 30 °C (Jevreinova a i. 1959). Tomuto predpokladu nasvedčuje aj znížená proteosyntéza napriek zvýšenej hladine nukleových kyselín. Zákonitosť vzťahu medzi prírastkom jaderného materiálu a rýchlosťou delenia bunky nie je týmto v podstate narušená, ale iba kvantitatívne ovplyvnená reakciou nukleoproteidového metabolizmu bunky na zníženie teploty. Táto reakcia je rozdielna, resp. odstupňovaná v závislosti od toho, či ide o mezofilný alebo psychofilný organizmus, pričom osobitná teplotná charakteristika jednotlivých enzýmov ostáva v neporušených bunkách zachovaná. V predchádzajúcich prácach sa to dokázalo napríklad u dehydrogenázovej aktivity a glukózoxydázy (Brown 1957, Ingraham a Bailey 1959), a ako tomu nasvedčujú výsledky tejto práce, platí to aj pri syntéze nukleových kyselín.

Práce pokračujú štúdiom vplyvu teploty na mononukleotidové zloženie jaderného materiálu mezofilných a psychofilných baktérií, so zvláštnym zreteľom na účinok mechanického poškodenia bunky, aby sa tou cestou objasnila otázka, či mechanizmus psychofilnosti spočíva v špecifičnosti enzýmov a nukleových kyselín alebo v organizácii bunky.

## Poďakovanie

Ďakujeme M. Grófovej za matematické spracovania výsledkov a M. Bánhegyiovej za technickú pomoc pri našej práci.

## Súhrn

Sledovali sa zmeny v syntéze nukleových kyselín (RNK, DNK) a bielkoviny u baktérií mezofilného kmeňa *Escherichia coli* B a psychofilného kmeňa *Pseudomonas fluorescens* pri znížení inkubačnej teploty z optima až na taký stupeň, pri ktorom sa generačná doba vyše desaťnásobne predĺžila. Zistilo sa;

a) že znížením inkubačnej teploty sa zvýši obsah nukleových kyselín v bunke a to menovite v lag fáze a vo fáze zrýchleného rastu, v ktorej hladina nukleových kyselín dosahuje maximum. Následkom toho aj počas ďalšieho rozmnožovania, keď prírastok nukleových kyselín menovite RNK pri zníženej inkubačnej teplote sa spomaľuje, ostáva celkové množstvo nukleových kyselín v bunke na relatívne zvýšenej hladine, s ňou sa však rozchádza proteosyntéza, ktorej hladina u mezofilnej kultúry poklesne.

b) že menšie ovplyvnenie biosyntézy DNK znížením teploty má svoj špecifický prejav v lag fáze *Escherichia coli*, ktorý závisí v tom, že pomerne rýchlejšie sa syntetizujúca DNK sa dostáva do disproporcie k RNK, ktorá sa vyváži prechodným zastavením produkcie DNK.

c) že odchýlky u sledovaných biosyntéz sa zvýraznili len za kultivácie mezofilnej kultúry, kým spomalený metabolizmus psychrofilných baktérií prebiehal aj pri suboptimálnych teplotách bez výraznej deviácie.

#### Literatúra

- Arpai J., Vplyv zmrazovacej teploty na kvótu odumierania a fyziologického poškodenia mikroorganizmov. *Biológia* 16 : 31, 1961.
- Arpai J., Selective effect of freezing as reflected in growth curves. *Folia microbiol. fluorescens and Escherichia coli. Appl. Microbiol.* 10 : 297, 1962.
- Arpai J., Selective effect of freezing as reflected in growth curves. *Folia microbiol.* 8 : 18, 1963.
- Brachet J., *Embryologie Chimique*, Musson et Cie, Paris, 1947, s. 230.
- Brown A. D., Some general properties of a psychrophilic pseudomonad: The effect of temperature on some of these properties and the utilization of glucose by this organism and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 17 : 640, 1957.
- Burns V. W., Cell division Synchronization. *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry* 12 : 1, 1962.
- Fischer F. G., v Hoppe-Seyler/Thierfelder Handbuch der physiologischen und pathologischen chemischen Analyse. Band IV., Kap. 2., S. 1316, Berlin (10. Auflage) 1960.
- Hagen P. O., Rose A. H., Studies on the biochemical basis of the low maximum temperature in a psychrophilic *Cryptococcus*. *J. Gen. Microbiol.* 27 : 89, 1962.
- Ingraham J. L., Bailey G. E., Comparative study of effect of temperature on metabolism of psychrophilic and mesophilic bacteria, *J. Bacteriol.* 77 : 609, 1959.
- Jevreinova T. N., Bunina N. N., Kuznecova N. V., Vlijanije temperatury na nukleinovyje kisloty *B. licheniformis*. *Biochimija* 24 : 912, 1959.
- Jevreinova T. N., Maslova S. V., Jermochina T. M., Sizova T. P., Vlijanije temperatury na nukleinovyje kisloty *Aspergillus fumigatus*. *Mikrobiologija* 29 : 516, 1960.
- Jevreinova T. N., Marčenko I. V., Loginova L. G., Ribonukleinovyje kisloty termofilnoj i mezofilnoj kultury *Saccharomyces cerevisiae* XII rasy. *Mikrobiologija* 30 : 453, 1961.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265, 1951.
- Malmgren B., Hedén C. G., Nucleotide metabolism of bacteria and the bacterial nucleus. *Nature* 159 : 577, 1947.
- Morse M. L., Carter C. E., The synthesis of nucleic acids in cultures of *Escherichia coli*, strains B and B/r. *J. Bacteriol.* 58 : 317, 1949.
- Ogur M., Rosen G., The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 25 : 262, 1950.
- Squires R. W., Hartsell S. E., Measurement of relative lag time. *J. Bacteriol.* 69 : 229, 1955.
- Weber E., *Grundriss der biologischen Statistik*. Fischer Verlag, Jena 1957.
- Wellerson R. jr., Tetrault Ph. A., The effect of various incubation temperatures on the ribonucleic acid production of a mesophilic and thermophilic bacterium. *J. Bacteriol.* 69 : 449, 1955.

#### ВЛИЯНИЕ ПОНИЖЕННОЙ ИНКУБАЦИОННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКА У МЕЗОФИЛЬНЫХ И ПСИХОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

#### Резюме

Проведились наблюдения за изменениями в синтезе нуклеиновых кислот (РНК, ДНК — рибонуклеиновых кислот и дезоксиуклеиновых кислот) и белка у бактерий мезофильного штамма *Escherichia coli* B и психрофильного штамма *Pseudomonas*

*fluorescens* при снижении инкубационной температуры, с оптимума по такую степень, на какой в этот возраст времени генерации приходился в десять раз. Оказалось, что:

а) с понижением инкубационной температуры повышается содержание нуклеиновых кислот в клетке, особенно в время «лаг-фазы» и фазы усиленного роста, в которых уровень нуклеиновых кислот (НК) достигает максимума. Вследствие этого и в время дальнейшего разложения, когда процент НК снижается, в отсутствии РНК при понижении инкубационной температуры, остается количество НК в клетке на сравнительно повышенном уровне, тогда как при синтезе у мезофильной культуры падает.

б) меньшая чувствительность биосинтеза ДНК на понижение температуры проявляется специфически в лаг-фазе *Escherichia coli*, таким образом, что сравнительно быстрая синтезирующая ДНК падает в диспропорцию по отношению к РНК, которая, в свою очередь уменьшается временно при постановке и выделения ДНК.

в) отклонения у наблюдаемых биосинтеза в былые исследованиях выражены только в время культивации мезофильной культуры, тогда как замедленный метаболизм психрофильных бактерий происходит даже при субоптимальных температурах, без яркой девиации.

# DER EINFLUSS SUBOPTIMALER INKUBATIONSTEMPERATUREN AUF DIE SYNTHESE DER NUCLEINSÄUREN UND PROTEINE MESOPHILER UND PSYCHROPHILER BAKTERIEN

## Zusammenfassung

Es wurden die Veränderungen bei der Synthese der Nucleinsäuren (RNS und DNS) und der Proteine von Bakterien des mesophilen Stammes *Escherichia coli B* und des psychrophilen Stammes *Pseudomonas fluorescens* unter suboptimalen Inkubationstemperaturen verfolgt, wobei die Temperatur bis auf so ein Grad erniedrigt wurde, dass die Generationszeit das Zehnfache überschritt. Die Versuchsergebnisse erbrachten:

a) dass infolge einer Herabsetzung der Inkubationstemperaturen der Nucleinsäuregehalt der Zelle ansteigt, dies insbesondere in der lag-Phase und in der Beschleunigungsphase. In der Letzteren erreicht das Niveau der Nucleinsäuren (NS) ihren Höhepunkt. Infolge dessen bleibt der NS-Gehalt der Zellen auch während des weiteren Wachstums, im Laufe dessen die NS-Synthese namentlich die RNS-Synthese langsamer wird, auf einem relativ hohen Ausmass. Dabei kommt es zu einer gewissen Divergenz mit der Proteosynthese, die bei der mesophilen Kultur ein Absinken verzeichnet.

b) dass die niedrigere Kälteempfindlichkeit der Biosynthese der RNS ihren spezifischen Ausdruck in der lag-Phase von *Escherichia coli* findet, indem die verhältnismässig schneller sich synthetisierende DNS in eine Disproportion zur RNS gerät, welche mittels einer temporären Abbremsung der DNS-Synthese ausgeglichen wird.

c) dass Abweichungen der verfolgten biosynthetischen Prozesse nur bei Kulturen mesophiler Bakterien beobachtet werden konnten, dagegen nahm der verlangsamte Stoffwechsel psychrophiler Bakterien auch unter den Bedingungen von suboptimalen Inkubationstemperaturen einen nicht wesentlich veränderten Verlauf.