

J. OPIEŃSKA-BLAUTH, M. KAŃSKI, L. STOBIŃSKA

## **Studia nad mechanizmem glikolizy w płynnych hodowlach pałeczki okrężnicy (*E. coli*)**

### **Studies on the mechanism of glucose metabolism *E. coli*.**

Poglądy, odnoszące się do mechanizmu glikolizy w komórkach drobnoustrojów są, jak dotychczas, mało ustalone i nie opierają się na jednoznacznych wynikach doświadczalnych. Najczęściej spotyka się zdanie, że mechanizm przemiany glukozy u większości drobnoustrojów nie różni się niczym od procesów glikolitycznych w tkankach, glikogenolizy mięśniowej, czy też fermentacji alkoholowej w drożdżach. Zagadnienie fosforylacji w przemianie węglowodanowej u drobnoustrojów wywołało szczególnie szeroką dyskusję w literaturze naukowej.

Badania nad mechanizmem fermentacji u drobnoustrojów zapoczątkował Harden (1) u *Escherichia coli* w 1901 r., a następnie u *B. lactis aerogenes* Harden i Walpole (2) w 1906 r. Zainteresowano się wówczas po raz pierwszy ilościowym przebiegiem fermentacji i metabolitami pośrednimi. Z chwilą udowodnienia słuszności schematu Embden—Meyerhoff—Parnas dla drożdży i tkanki mięśniowej pojawia się cały szereg prac, mających na celu wykazanie tego schematu w przebiegu przemiany węglowodanowej u różnych drobnoustrojów. Większość badaczy posługiwała się w swych doświadczeniach wyciągami acetonowymi z wysuszonych bakterii, ale przeprowadzono także badania na żyjących, świeżych bakteriach. Głównym punktem zainteresowania tych prac była przemiana poszczególnych metabolitów pośrednich, znanych z procesów przemiany węglowodanowej w drożdżach i mięśniach. I tak np. Antoniani (3) w 1935 r. wykazał, że *E. coli* tworzy kwas pyrogronowy z kwasu fosfoglicerynowego, a Tikka (4) w 1935 r., pracując na wyciągach z *E. coli*, otrzymał z estru fruktozodwufosforowego i kwa-

su fosfoglicerynowego te same produkty, które występują przy fermentacji glukozy.

Podobne rezultaty osiągnęli w 1937 r. Werkman, Stone, Wood (5) u *B. lactis aerogenes* i *B. propionicum* posługując się w doświadczeniach estrami heksozofosforowymi. Następne lata przynoszą szereg prac potwierdzających słuszność schematu Embden—Meyerhoff—Parnas odnośnie mechanizmu glikolizy u drobnoustrojów. S. Endo (6) opisał rolę estru heksozodwufosforowego, Still (7) stwierdził w wyciągach *E. coli* dehydrogenazę fosfortriozową i potwierdził przewidywania Neubergera i Kobel'a (8) znajdując aldolazę w tychże wyciągach, a Utter i Werkman (9) prócz tego enzymu wykryli także izomerazę w komórkach tego drobnoustroju. Le Page i Umbreit (10) wyizolowali wszystkie metabolity biorące udział w mechanizmie fosforylacyjnym rozpadu glukozy według wspomnianego wyżej schematu; w końcu Barron (11) stwierdził, że ester Harden-Younga (fruktozodwufosforowy) zajmuje główną pozycję w procesach glikolizy u bakterii, podobnie jak u pleśni i drożdży.\*

Pomimo mocnych podstaw dla przyjęcia schematu Embden—Meyerhoff—Parnas, jako ogólnie obowiązującego mechanizmu katabolicznej przemiany węglowodanów, pojawiły się prace, których wyniki nie dawały pogodzić się z tym ogólnie przyjętym, poglądem.

Zastrzeżenia takie podniósł Tikka (4), który nie potrafił stwierdzić wiązania fosforu nieorganicznego przez wysuszone bakterie.

Needham (12), (13), (14) i jego współpracownicy uważali, że glikoliza wg. schematu Embden—Meyerhoff—Parnas zachodzi jedynie w wypadku zniszczenia struktury komórkowej, podczas gdy normalny katabolizm glukozy przebiega w sposób nefosforylacyjny. Wyniki prac Needhama poddali surowej krytyce Meyerhoff i Perdigon (15), jak również nie znalazły one potwierdzenia w późniejszych doniesieniach Mann'a i Quastel'a (16) oraz MacFarlane i Weil-Malherbe'a (17).

W interesujących doświadczeniach prowadzonych na żywych komórkach *Fusarium gramineum*, Dammann, Rotini i Nord (18), wykazali minimalny udział fosforu nieorganicznego w procesie fermentacji glukozy. Spostrzeżenia te potwierdzone zostały badaniami Dammanna (19), O'Connora (20) i Norda (21).

MacFarlane (22) oraz Nilsson i Alm (23) posuwają się tak daleko, że zadają pytanie, czy znajdowane ufosforylowane metabolity są bezpośrednio związane z pierwotnymi procesami odbywającymi się w żywych komórkach, czy też produktami wtórnymi, powstającymi po dezintegracji komórek.

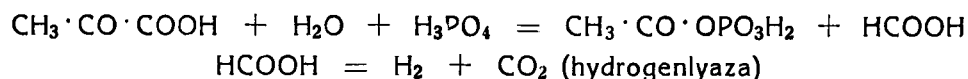
Barron (24) wypowiada pogląd, że glikoliza fosforylacyjna występuje dopiero na wyższym szczeblu ewolucyjnym, podczas gdy u niżej stojących organizmów, np. grzybów, drożdży i bakterii, może zachodzić fermentacja niefosforylacyjna.

Klasyczne już dzisiaj prace Lipmanna (25) rzuciły nowe światło na rolę mechanizmów fosforylacyjnych w przemianie węglowodanowej i dostarczyły nowego poparcia teoriom o fosforolitycznym mechanizmie glikolizy bakteryjnej, zwłaszcza zaś wykrycie acetylofosforanu przez tego autora w metabolitach bakteryjnych wskazywało na udział wymienionego związku w mechanizmach zarówno anabolicznych, jak i katabolicznych. Badania Lipmanna i Tuttle'a (27), stały się punktem wyjścia dla całego szeregu prac doświadczalnych na wyciągach bakteryjnych, których wyniki pozwoliły wnikać głębiej w zagadnienie mechanizmu fosforylacyjnego.

Koepsell i Johnson (29), (30) wykazali zależność reakcji hydroklastycznej (właściwie — fosforoklastycznej) od obecności fosforanu nieorganicznego oraz zauważyli, że w nieobecności glukozy tworzy się labilny acetylofosforan, dopiero zaś po dodaniu glukozy powstają trwałe estry heksozofosforowe. Wnioski tych autorów potwierdzili Kalmitz i Werkman (31).

Utter i Werkman (32) u bakterii dezintegrowanych przez ucieranie z pyłem szklanym wykazali, w razie nieobecności akceptora fosforanowego (kwasu adenilowego), nagromadzenie się acetylofosforanu. Po dodaniu kwasu adenilowego gromadził się wyłącznie kwas adenozyntroójfosforowy.

Według Utter'a, Werkman'a i Lipmann'a (33) reakcja fosforoklastyczna jest odwracalna:



Utter, Krampitz i Werkman (34) wykryli, że istnieją różnorodne drogi przemiany acetylofosforanu u drobnoustrojów.

Lipmann przypuszcza, że labilne związki fosforowe — typu acetylofosforanu — odgrywają zasadniczą rolę w przemianie węglowodanowej w tkankach zwierzęcych. Potwierdzenia tej tezy możnaby doszukiwać się w dawniejszych doświadczeniach Banga (35), przeprowadzonych na wyciągach mózgowych. Z tymi poglądami nie zgadza się Ochoa (36), jednakże doświadczenia Lipmanna i Tuttle'a (37), przeprowadzone na wątrobach gołębi, przemawiają za tworzeniem się acetylofosforanu na drodze enzymatycznej fosforylacji kwasu octowego.

Dotychczasowe badania nad przemianą węglowodanową u drobno-ustrojów dokonywane przeważnie na bezkomórkowych wyciągach bakteryjnych dają jedynie fragmentaryczne obrazy. W szczególności poglądy na mechanizmy fosforylacyjne w przemianie węglowodanowej drobno-ustrojów pozostają jeszcze w sferze przypuszczeń, a nie pewników. Nasuwa się zasadnicza wątpliwość, czy doświadczenia przeprowadzane wyłącznie na wyciągach bakteryjnych mogą dać pewny i pełny obraz mechanizmów metabolicznych w żywych komórkach.

Można przypuszczać, że zniszczenie struktury komórkowej spowoduje znaczne odchylenie od normalnego przebiegu reakcji enzymatycznych w sensie osłabienia, względnie zniesienia czynności jednych układów enzymatycznych z równoczesnym ujawnieniem, względnie wzmożeniem czynności innych układów.

Wątpliwości takie wysuwał już Sachs (38) w 1941 r. oraz Barron (24) w 1943 r. w dyskusjach nad izolowanymi systemami enzymatycznymi.

Celem naszej pracy było zbadanie mechanizmu glikolizy w płynnych hodowlach *Escherichia coli* — w świetle omówionych wyżej zagadnień.

## Metodyka badań

### 1. Podłoże

Doświadczenia wykonywane w ramach niniejszej pracy miały wykazać, czy istnieje możliwość uzyskania poglądu na mechanizm przemiany glukozy u *E. coli* przy zastosowaniu techniki, polegającej na ilościowym oznaczaniu zmian w składzie chemicznym środowiska, w którym wzrastał wymieniony drobnoustrój. Nie przeprowadzono natomiast wcale badań nad samymi komórkami bakteryjnymi, które z reguły oddzielano od podłoża przed dokonaniem oznaczeń.

Ze względów natury praktycznej wybór padł na płynne podłoże syntetyczne sporządzone specjalnie dla bakterii *E. coli* podane przez Kosea (39).

Skład chemiczny tego podłoża jest następujący:

glukoza (jako jedyne źródło węgla)	2,0 g.
fosforan amonowy I-rzędowy (jako źródło azotu)	1,0 „
„ potasowy II-rzędowy	1,0 „
siarczan magnezowy ( $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ )	0,2 „
chlerek sodowy	5,0 „
woda destylowana	1000,0 „

Wszystkie składniki, z wyjątkiem siarczanu magnezowego, miały wysoki stopień czystości chemicznej („pro analysi“). Po rozpuszczeniu

składników i uzupełnieniu objętości wodą destylowaną wyjaławiano podłoże trzykrotnie w bieżącej parze wodnej w ciągu 20 min. za każdym razem. Następnie rozlewano je jałowo po 10 ml do szeregu wyjałowionych erlenmajerek o pojemności 25 ml, poczym erlenmajerki wraz z podłożem przechowywano w chłodni w temperaturze ok.  $-4^{\circ}\text{C}$  aż do chwili inokulacji zawiesiną bakteryjną.

## 2. Drobnoustrój

W badaniach korzystano ze szczepu *E. coli* dostarczonego przez Zakład Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego U. M. C S. Szczep ten rósł na agarze skośnym w temp. pokojowej, ale na 24 godz. przed inokulacją przesiewano go na 5 — 9 agarów skośnych i umieszczano w cieplarni w temp.  $37^{\circ}\text{C}$ . Po upływie 24 godzin pobierano po 6 pełnych uszek ezy platynowej hodowli z każdego z agarów do 25 ml jałowego roztworu 0,9% NaCl. Przez dokładne wymieszanie otrzymywano jednolitą zawiesinę komórek bakteryjnych, którą dodawano następnie do świeżo przygotowanego podłoża Koserera, ogrzanego uprzednio do  $37^{\circ}\text{C}$ . Ilość dodawanej zawiesiny wahała się w różnych okresach pracy, ale zasadniczo wynosiła 0,5 ml na 10 ml podłoża.

Oprócz inokulowanych erlenmajerek pozostawiano stale odpowiednią ilość erlenmajerek nieinokulowanych, dla kontroli.

## 3. Inkubacja hodowli

Po dokonanej inokulacji wstawiano hodowlę wraz z erlenmajerkami kontrolnymi do cieplarki o temp.  $37^{\circ}\text{C}$  i notowano czas rozpoczęcia inkubacji. W ciągu niniejszej pracy okresy inkubacyjne obejmowały dwa cykle zasadnicze: 24-ro godzinny i 96-cio godzinny.

W pierwszym cyklu (głównym) próbki pobierano po inkubacji 1-no, 4-ro, 9-cio i 24-ro godzinnej; w drugim po 24-ro, 48-mio, 72-u i 96-cio godzinnej.

Wszystkie doświadczenia przeprowadzano na hodowlach *E. coli* rosnących w warunkach tlenowych.

## 4. Oznaczenia

### a) *Oznaczanie ilości komórek bakteryjnych metodą nefelometryczną.*

W zasadzie oparto się na technice nefelometrycznej opisanej przez Mc Farlanda (40), polegającej na porównywaniu wizualnym wzorców nefelometrycznych z badanymi zawiesinami bakteryjnymi. Wzorce przygotowuje się przez zmieszanie odpowiednich objętości 1% roztworu kwasu siarkowego z 1% roztworem chlorku barowego. Koniecznym warunkiem jest dobranie odpowiedniej ilości jednakowych próbek, zamykanych hermetycznie, oraz posługiwanie się zawiesinami bezbarwnymi.

Okazało się jednak, że cyfr podanych dla ilości bakterii w 1 ml przez Mc Farlanda nie można przyjmować bezkrytycznie, gdyż na ścisłość oznaczeń mają wpływ: rodzaj, natężenie i kierunek padania światła przy odczytywaniu wyników, a także wielkość i kształt komórek bakteryjnych w badanej zawieszynie. Z tego powodu użyto do oznaczeń fotokolorymetru przy zastosowaniu filtra C, po przystosowaniu objętości wzorców nefelometrycznych do objętości stojących do dyspozycji naczyń kolorymetrycznych. Po sporządzeniu krzywej wzorcowej można było skorygować dane Mc Farlanda dotyczące ilości komórek bakteryjnych odpowiadającej określonemu zmętnieniu i dostosować je do aktualnych warunków doświadczalnych.

Niżej zamieszczona tabela podaje znalezione zależności.

TABELA 1.

Nr wzorca	10/0 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> w ml	10/0 BaCl <sub>2</sub> w ml	T w %	Ilość bakterii w 1 ml dla danego zmętnienia
0	0,00	0,00	100,0	0
1	9,99	0,01	98,0	330.000
2	9,98	0,02	95,5	660.000
3	9,97	0,03	93,5	990.000
4	9,96	0,04	91,5	1.320.000
5	9,95	0,05	89,5	1.650.000
6	9,94	0,06	88,0	1.980.000
7	9,93	0,07	86,5	2.310.000
8	9,92	0,08	85,5	2.640.000
9	9,91	0,09	84,0	2.970.000
10	9,90	0,10	83,0	3.330.000
11	9,80	0,20	72,0	6.600.000
12	9,70	0,30	60,0	10.000.000
13	9,60	0,40	51,0	13.300.000
14	9,50	0,50	43,0	16.600.000
15	9,40	0,60	38,0	20.000.000
16	9,30	0,70	35,0	23.300.000
17	9,20	0,80	33,0	26.600.000
18	9,10	0,90	32,0	30.000.000

UWAGA: T= przepuszczalność świetlna.

b) *Oznaczenie pH.*

Do oznaczeń pH używano autojonometru firmy „Radiometer“ w Kopenhadze.

c) *Oznaczanie stopnia redukcji.*

Stopień redukcji w badanych próbach wyrażano w mg glukozy oznaczanej metodą Hagedorn i Jensena (41).

d) *Oznaczanie fosforanów nieorganicznych.*

Początkowo oznaczeń fosforanów nieorganicznych dokonywano metodą Bodansky'ego (42) następnie jednak z powodu trudności przystosowania tej metody do oznaczania fosforu związanego organicznie, stale używano klasycznej metody Fiske-Subbarowa, pomimo nieco mniejszej jej czułości.

e) *Oznaczanie „prawdziwego“ fosforanu nieorganicznego.*

Nomenklaturę odnośnie poszczególnych frakcji fosforanowych zaczerpnięto z bieżącej literatury anglosaskiej, głównie z prac Lipmanna i Tuttle'a (27), z których przyjęto całą stronę metodyczną oznaczania prawdziwego fosforanu nieorganicznego i fosforanu labilnego (acetylofosforanu).

f) *Oznaczanie fosforanów związanych organicznie.*

Oznaczeń dokonywano metodą Fiske-Subbarowa w hydrolizatach badanych próbek. Do przeprowadzenia hydrolizy używano 2 N kwasu solnego w objętości równej badanej próbki. Hydrolizę przeprowadzano na wrzącej łaźni wodnej i oznaczano fosforany nieorganiczne w roztworach uzyskanych po hydrolizie 7-mio minutowej, 30-to minutowej i 60-cio minutowej. Prócz tego oznaczano t. zw. fosfor całkowity przez spalanie próbki w obecności 1 ml 2 N kwasu siarkowego i 0,2 ml 2 N kwasu azotowego aż do ukazania się pierwszych białych dymów  $SO_3$ . Po oziębieniu mieszaniny dodawano 3 ml wody i ponownie ogrzewano aż do zagęszczenia płynu do objętości 1 ml, płyn przenoszono ilościowo do kolbki miarowej na 25 ml i przeprowadzano kolorymetryczne oznaczanie fosforanu jak podano wyżej.

## **Badania własne**

### **I. Wpływ odchyień od wzorcowych warunków doświadczalnych**

#### **1. Rola czasu trwania inkubacji.**

Wobec tego, że w ciągu wykonywania niniejszej pracy kilkakrotnie zmieniano niektóre warunki, a mianowicie szczep *E. coli*, ilość zawiesiny bakteryjnej dodawanej do podłoża oraz stężenie glukozy w pod-

łożu, przeto byłoby nieuzasadnione zestawianie wszystkich serii doświadczeń na jednej tabeli.

Analizując przebieg krzywych spadku redukcji, przyrostu masy bakteryjnej i spadku pH w ciągu całego okresu doświadczenia w próbkach, zawierających normalne płynne podłoże syntetyczne wg. K o s e r a, można dostrzec, że :

- a) największą szybkość przyrostu zmian wykazuje krzywa szybkości przyrostu masy bakteryjnej, która w naszych doświadczeniach była przeciętnie ok. sześciokrotnie większa od szybkości spadku redukcji (a więc od szybkości glikolizy), przy maksymalnych szybkościach tych obu zmiennych.
- b) Szybkość spadku pH w początkowych okresach inkubacji jest naogół ok. 4-krotnie mniejsza od szybkości spadku redukcji w danym okresie. Szybkość spadku pH wzrasta znacznie w dalszych okresach inkubacyjnych.

## **2. Wpływ ilości inokulowanych bakterii**

W niniejszej pracy stwierdzono, że niewielkie odchylenia od stale stosowanej ilości *E. coli* dodawanej do podłoża w postaci zawiesiny nie posiadają decydującego wpływu na wzajemny stosunek szybkości zmian ilościowych składników podłoża w poszczególnych okresach doświadczenia. Bardzo znaczny wpływ ma natomiast zmiana jednego szczepu *E. coli* na szczep inny, niż poprzednio używany.

Ponieważ pewne grupy doświadczeń przeprowadzono w jednakowych warunkach z tym jednak, że nie można było zastosować identycznego szczepu bakteryjnego, przeto bezpośrednie porównywanie wyników takich doświadczeń nie byłoby celowe. Z tego też powodu nie podaje się na tym miejscu żadnych danych cyfrowych.

## **3. Wpływ pH podłoża i jego zmian w czasie inkubacji**

Ponieważ zaobserwowano w czasie doświadczeń, że niezależnie od czasu trwania doświadczenia, ilości inokulowanych bakterii oraz stężenia niektórych składników podłoża, zahamowanie spadku redukcji i przyrostu masy bakteryjnej występuje regularnie przy jednoczesnym spadku pH poniżej 4,5, przeto postanowiono upewnić się co do decydującego wpływu pH podłoża na wstrzymanie rozwoju *E. coli*. W tym celu wykonano trzy równoległe i w jednakowych warunkach doświadczalnych pozostające próby :

- a) z normalną hodowlą bakteryjną na zwykłym podłożu o pH 6,80,
- b) z hodowlą bakteryjną na podłożu doprowadzonym do pH 5,10 za pomocą kwasu solnego,



c) z hodowlą bakteryjną na podłożu zakwaszonym do pH 3,80 przy pomocy kwasu solnego.

Wyniki tych doświadczeń są zestawione w tabeli 2.

Analizując je dochodzimy do następujących wniosków:

1. — ogólnie biorąc w próbie „b” widoczne jest znaczne zahamowanie i opóźnienie wszystkich procesów życiowych.
2. — maxima szybkości w próbie „b”, w danych warunkach doświadczalnych opóźniają się o ok. 8 godzin w porównaniu z maximami szybkości w próbie kontrolnej.
3. — maximum szybkości przyrostu masy bakteryjnej w próbie „b” jest ok. 5-krotnie mniejsze, niż odpowiednie maximum w próbie kontrolnej „a”. Maximum szybkości spadku redukcji w próbie „b” jest 10 razy mniejsze, niż w próbie „a”. Maximum szybkości spadku pH w próbie „b” jest prawie 2 razy mniejsze od odpowiedniego maximum w próbie „a”.

Z powyższego wynika, że przy zakwaszaniu podłoża, hamowaniu ulegają w pierwszym rzędzie procesy glikolityczne. Poniżej pH 4,0 ustaje czynność metaboliczna żywych komórek E.Coli.

#### 4. Wpływ zmian stężenia składników podłoża

Zmiany stężenia fosforanów w podłożu Koseira.

Całkowity brak jonów fosforanowych.

Doświadczenia przeprowadzono w ten sposób, że nie zmieniając stężenia jonowego, względnie cząsteczkowego, innych składników podłoża, usunięto całkowicie jony fosforanowe.

Wykonano trzy serie doświadczeń, w których jako źródło azotu występowały: azotan amonowy, chlorek amonowy i siarczan amonowy. W żadnej z wymienionych serii nie zaobserwowano ani przyrostu masy bakteryjnej, ani zmian w redukcji, poza pierwszą godziną inkubacji.

Zmniejszone stężenie jonów fosforanowych.

W tabeli 3 zestawiono dane odnoszące się do 24 godzinnego doświadczenia przy zastosowaniu różnych stężeń fosforanów. Okazuje się, że zmniejszenie stężenia fosforanów powoduje znaczne obniżenie całkowitego spadku redukcji oraz szybkości spadku redukcji.

W serii zawierającej fosforany w stężeniu podanym w klasycznym przepisie K o s e i r a ( $0,014 \text{ M PO}_4^{3-}$ ) obserwuje się najwydatniejszy spadek redukcji.

Przy całkowitym braku fosforanów w podłożu spadek redukcji występuje tylko w pierwszej godzinie inkubacji, podczas gdy w następnych godzinach nie spostrzega się żadnego spadku redukcji.

TABELA 2.

Czas inkubacji w godz.	Stężenie glukozy w mg %			Globalny spadek redukcji w %			Szybkość spadku redukcji w %/godz.			p H			Szybkość spadku p H w %/godz.			Ilość komórek bakteryjnych w I ml.			Szybkość przyrostu masy bakterijnej w %/godz.		
	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B
0	531	525	525	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,80	5,10	3,80	0,0	0,0	0,0	330.000	330.000	330.000	0,0	0,0	0,0
1	477	525	525	10,16	0,0	0,0	10,17	0,0	0,0	6,40	5,10	3,80	5,82	0,0	0,0	330.000	330.000	330.000	0,0	0,0	0,0
4	450	525	525	15,25	0,0	0,0	2,09	0,0	0,0	5,40	5,10	3,80	5,20	0,0	0,0	660.000	330.000	330.000	33,3	0,0	0,0
9	435	504	525	18,87	4,00	0,0	0,66	0,80	0,0	4,50	4,50	3,80	3,33	2,35	0,0	1,320.000	660.000	330.000	20,0	20,0	0,0
24	408	483	525	23,16	8,00	0,0	0,41	0,20	0,0	4,10	4,10	3,80	0,59	0,59	0,0	1,650.000	803.000	330.000	1,66	1,44	0,0

N = podłoże Koser a wzbogacone w glukozę o p H 6,08  
 A = " " " " o p H 5,10  
 B = " " " " o p H 3,80

TABELA 3.

Czas inkub. w godz.	Stężenie glukozy w mg %						Globalny spadek redukcji w %						Szybkość spadku redukcji w %/godz.						p H					
	N	A	B	C	N	A	B	C	N	A	B	C	N	A	B	C	N	A	B	C	N	A	B	C
0	492	498	489	492	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,10	7,00	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10
1	351	477	471	471	29,0	6,0	6,0	6,0	28,6	5,9	3,6	4,2	28,6	5,9	3,6	4,2	7,10	6,90	6,90	7,10	7,10	6,90	7,10	7,10
4	330	477	375	387	33,0	6,0	25,0	22,0	1,9	0,0	10,1	8,9	1,9	0,0	10,1	8,9	7,00	6,70	6,84	7,00	7,00	6,84	7,00	7,00
9	270	477	306	342	46,0	6,0	39,0	31,0	2,5	0,0	3,6	2,3	2,5	0,0	3,6	2,3	6,75	5,70	6,70	7,00	7,00	6,70	7,00	7,00
24	237	477	291	291	53,0	6,0	41,0	41,0	1,1	0,0	0,3	0,9	1,1	0,0	0,3	0,9	6,30	5,50	6,30	6,30	6,30	5,50	6,30	6,80

Objaśnienie: N = podłoże normalne, A = podłoże o stężeniu 0,0 M PO<sub>4</sub> ...  
 B = podłoże o stężeniu 0,0005 M PO<sub>4</sub> ...  
 C = " " " " 0,02 M PO<sub>4</sub> ...

## 5. Wpływ stężenia glukozy na przebieg glikolizy

Przeprowadzone dwie odmiany tego rodzaju doświadczeń: z normalnym podłożem Koseira o stężeniu glukozy 200 mg<sup>0</sup>%, oraz z podłożem Koseira wzbogaconym w glukozę o stężeniu 600<sup>0</sup>%. Wyniki doświadczeń ilustruje niżej podana tabela 4.

T A B E L A 4.

Czas inkubacji w godzinach	Globalny spadek redukcji w %		Szybkość spadku redukcji w %/godz.	
	N	A	N	A
0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	—	9,3	—	9,3
4	—	13,6	—	2,4
9	—	29,1	—	3,6
24	34,3	44,0	1,43	1,40
48	44,0	62,6	0,67	1,38
72	55,0	76,3	0,78	1,53
96	71,5	80,1	1,51	0,68

Objaśnienie: N = podłoże normalne Koseira; A = wzbogacone w glukozę

W podłożu wzbogaconym w glukozę globalny spadek redukcji oraz szybkość spadku redukcji jest większa niż w normalnym. Równoległe z tym odpowiednio zwiększa się przyrost masy bakteryjnej.

## 6. Wpływ warunków beztlenowych na glikolizę

Porównanie przebiegu redukcji w hodowlach *E. coli* w warunkach tlenowych i beztlenowych przeprowadzono w jednym tylko doświadczeniu, z którego wynikało, że redukcja w warunkach tlenowych osiąga większy spadek i że spadek ten następuje szybciej. Jednakże trzeba się zastrzec, że przez warunki tlenowe wzrostu bakterii należy rozumieć pozostawienie hodowli *E. coli* w małych erlenmajerkach, zamkniętych luźnym korkiem z ligniny w całkowitej nieruchomości w ciągu inkubacji. Warunki anaerobowe uzyskano przy hodowaniu bakterii w zamkniętym naczyniu, gdzie ponad płynną hodowlą znajdowała się atmosfera, pozbawiona tlenu, przez użycie odpowiedniej ilości pyrogallolu i ługu sodowego.

## 7. Wpływ jonów magnezu na przebieg glikolizy

Z zamieszczonej tabelki 5 wynika, że brak jonów Mg<sup>++</sup> nie znosi zdolności *E. coli* do wzrostu, niemniej jednak wzrost ten jest w znacznej



mierze zahamowany i opóźniony. To samo można powiedzieć o szybkości spadku redukcji i spadku pH, przy czym można zauważyć, że podłoże, pozbawione magnezu wykazuje ten sam stopień zakwaszenia, co podłoże normalne, wzbogacone w glukozę.

## 8. Wpływ jonów potasu na przebieg glikolizy

Przy analizie danych zamieszczonych w tabeli 6 uderza prawdopodobne zupełne zahamowanie przyrostu masy bakteryjnej przy jednoczesnym znacznym obniżeniu szybkości spadku redukcji, przesunięciu max. szybkości spadku redukcji na okres dalszy, oraz nieproporcjonalnie duży spadek pH.

## II. Wpływ zmiennych warunków doświadczenia na przebieg glikolizy

### 1. Wpływ inhibitorów

#### a) Wpływ fluorku sodowego.

Z podanej tabeli 7 wynika, że fluorki w stężeniu zarówno 0,1 M jak i 0,02 M w pierwszym okresie inkubacji nie wywierają wpływu na przebieg glikolizy, lub też daje się zauważyć nawet pewien wpływ pobudzający. Jeżeli przy tym podkreślić brak przyrostu masy bakteryjnej w ciągu następnych okresów inkubacji, to wówczas zahamowanie spadku redukcji w tych okresach stanie się tylko pozorne.

Jednocześnie widać, że w ciągu glikolizy zakwaszenie podłoża jest tylko bardzo nieznaczne, jeżeli nie brak go zupełnie. Wskazywałoby to na fakt, że sam proces glikolizy przebiega bez zakwaszenia podłoża, a więc bez wytwarzania się produktów o charakterze kwasowym, a samo zakwaszenie należałoby odnosić raczej do przemian o charakterze anabolicznym, związanych z wzrostem lub rozmnażaniem się *E. coli*. Fluorek sodowy wywiera znaczny wpływ na procesy anaboliczne. Por. rys. 1.

RYŚ. 1.

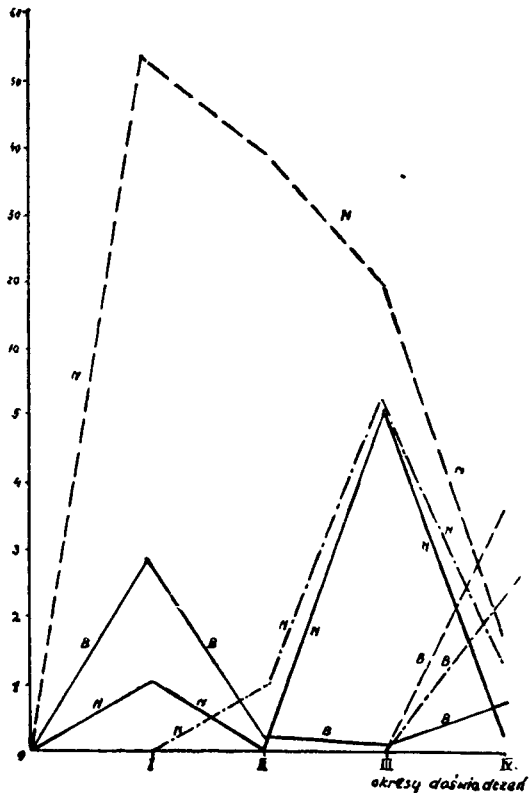


TABELA 7.

Czas inkubacji w godz.	Stężenie glukozy w mg/0/a			Globalny spadek redukcji w %			Szybkość spadku redukcji w %/godz.			pH			Spadek pH w %			Szybkość spadku pH w %/godz.			Ilość bakterii w 1 ml.			Wzrost masy bakteryjnej w %			Szybkość wzrostu masy bakt. w %/godz.		
	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B
0	552	531	525	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	7,10	7,10	7,2	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	150.000	150.000		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	546	516		2,0	3,0		1,08	2,88		7,10	7,10		0,0	0,0		0,00	0,00		231.000	150.000		54,0	0,0		54,00	0,0	
4	546	513		2,0	4,0		0,00	0,19		6,90	7,10		3,0	0,0		0,93	0,00		500.000	150.000		233,3	0,0		38,81	0,0	
9	381	510		31,0	4,0		6,04	0,11		4,50	7,10		37,0	0,0		6,95	0,00		1.000.000	150.000		566,0	0,0		20,0	0,0	
24	166	450		34,0	16,0		0,26	0,78		3,60	4,70		50,0	34,0		1,33	2,25		1.320.000	250.000		780,0	66,0		2,13	3,60	
24	426			423	18,0		20,0	0,76		0,80	5,7		5,6	21,0		23,0	0,86		0,92								
48	318			312	39,0		41,0	1,05		1,09	5,7		5,6	21,0		23,0	0,00		0,0								
72	168			312	68,		41,0	1,96		0,0	5,6		5,6	23,0		23,0	0,07		0,0								
96	114			264	78,0		50,0	1,35		0,64	5,5		5,4	24,0		25,0	0,07		0,14								

Objaśnienie: N = normalne podłoże Koserera wzbogacone w glukozę.

A = podłoże wzbogacone w glukozę + NaF w stężeniu 0,1 M,

B = " " " " + NaF " " 0,02 M.

Doświadczenie A i B przeprowadzono w różnych warunkach jeśli chodzi o szczep bakteryjny i w różnych czasach inkubacji.

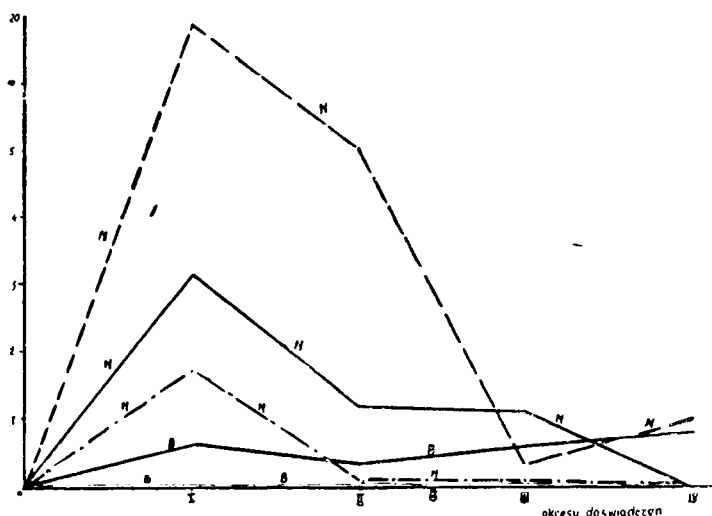
b) *Wpływ kwasu jodooctowego na przebieg glikolizy.*

Jak wynika z tabeli 8 kwas jodooctowy (użyto jodooctanu sodowego) w stężeniu 0,0001 M w pierwszym okresie inkubacji (24 godziny) hamuje w pewnym stopniu glikolizę, ale w następnych 72 godzinach wywiera raczej wpływ pobudzający. W ogólnym bilansie całkowity % spadku redukcji jest identyczny z podłożem normalnym.

Przy stężeniu 0,0005 M przebieg glikolizy jest analogiczny jak w podłożu normalnym.

Przy stężeniu 0,0025 M zaznacza się wyraźny wpływ hamujący kwasu jodooctowego, jednakże maleje on stale w ciągu czasu trwania inkubacji. Por. rys. 2, oraz tabelę 8a.

RYS. 2.



Kompletne zahamowanie przy tym stężeniu dotyczy przyrostu masy bakteryjnej. Oznacza to, że praktycznie biorąc, stale wzrasta natężenie glikolizy, przyczym nie zaznacza się spadek pH, co można podobnie interpretować, jak w przypadku wpływu fluorków. Przy stężeniu 0,005 M kwas jodooctowy całkowicie hamuje glikolizę, wzrost bakterii i spadek pH.

c) *Wpływ cyanku potasowego.*

Cyanek potasowy w stężeniu 0,05 M całkowicie hamuje wzrost bakterii, glikolizę i zmiany pH.

d) *Wpływ florydzyiny na przebieg glikolizy.*

Z danych, zgromadzonych w załączonej tabeli, wynika, że florydzyina w stężeniach 0,007 M oraz w stężeniu 0,008 M wywiera widoczny wpływ hamujący na przebieg glikolizy, zwiększający się w ciągu trwania inkubacji. Wpływ hamujący na wzrost bakterii jest również widoczny,





jakkolwiek jest on niewielki w porównaniu z poprzednio omawianymi inhibitorami. Biorąc to pod uwagę, spadek glikolizy nie byłby zahamowany w tym stopniu, jakby to wynikało z bezpośrednich interpretacji danych zawartych w tabeli 9. W związku z przyrostem masy bakteryjnej spadek pH jest od początku inkubacji dobrze zaznaczony.

e) *Wpływ azydku sodowego na przebieg glikolizy.*

Azydki sodowe ( $\text{NaN}_3$ ) w stężeniu 0,01 M oraz 0,05 M hamuje całkowicie glikolizę, zmiany pH i wzrost bakterii.

f) *Wpływ 2, 4-dwunitrofenolu na przebieg glikolizy.*

2, 4-dwunitrofenol w stężeniu 0,005 M hamuje całkowicie glikolizę, jednakże daje się zauważyć pewien niewielki spadek pH, pojawiający się w dalszych okresach inkubacji.

Ponieważ 2, 4-dwunitrofenol zabarwił całą hodowlę na żółto, oraz nie rozpuścił się całkowicie w podłożu, przeto niemożliwe było oznaczenie nefelometryczne ilości bakterii. Stąd też nie jest jasne, czy 2, 4-dwunitrofenol w tym stężeniu hamuje tylko glikolizę całkowicie, a nie hamuje w tym samym stopniu wzrostu bakterii, o czym mógłby pośrednio świadczyć spostrzegany spadek pH. Por. dane zestawione w tabeli 10.

2, 4-dwunitrofenol w stężeniu 0,00006 M wykazuje wyraźny wpływ na przebieg glikolizy, w początkowym okresie inkubacji, obniżając znacznie szybkość spadku redukcji do 4-ej godziny inkubacji. Późniejszy przebieg zmian redukcji i pH jest bardzo zbliżony do zmian w podłożu normalnym.

g) *Wpływ kwasu malonowego na przebieg glikolizy.*

Do doświadczeń użyto malonianu sodowego w stężeniu 0,001 M. Jak wynika z załączonej tabeli 11, malonian sodowy w tym stężeniu hamuje nieco przebieg glikolizy, natomiast pobudza przyrost masy bakteryjnej, zwłaszcza w pierwszym okresie doświadczenia. Zmiany w spadku pH pokrywają się naogół ze zmianami w podłożu normalnym.

h) *Wpływ chlorowodoru hydroksylaminy na przebieg glikolizy.*

Chlorowodorek hydroksylaminy w stężeniu 0,002 M hamuje całkowicie glikolizę, wzrost bakterii i spadek pH.

i) *Wpływ  $\beta$ -naftylaminy na przebieg glikolizy.*

Użyto  $\beta$ -naftylaminy w stężeniu 0,0065 M w roztworze wodnym. Ponieważ płyn wykazywał pewne zmętnienie od nierozpuszczalnych cząstek inhibitora, przeto oznaczanie ilości bakterii stosowaną metodą nefelometryczną było nie możliwe.

Z załączonej tabeli 12 wynika, że  $\beta$ -naftylamina bardzo silnie hamuje przebieg glikolizy, zwłaszcza w początkowych okresach inkubacji. Spadek pH odbywa się tylko w bardzo nieznacznym stopniu.

TABELA 9.

Czas inkubacji w godz.	Stężenie glukozy w mg/0/0			Globalny spadek redukcji w 0/0			Szybkość spadku redukcji w 0/0/godz.			Hp			Spadek pH w 0/0			Szybkość spadku pH w 0/0/godz.			Ilość bakterii w 1 ml.			Wzrost masy bakteryjnej w 0/0			Szybkość wzrostu masy bakt. w 0/0/godz.			
	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	N	A	B	
0	552	537	585	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,0	7,10	6,90	7,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	150.000	150.000		0,0	0,0		0,00	0,0	
1	546	534		12,0	1,0		1,08	0,55		7,10	6,80		0,0	5,0		0,0	1,45		231.000	231.000		54,0	54,0		54,0	54,0		
4	546	531		12,0	2,0		0,00	0,18		6,90	6,60		3,0	7,0		0,93	0,98		500.000	300.000		233,0	100,0		38,81	9,62		
9	381	471		31,0	13,0		6,04	2,26		4,50	4,80		37,	31,0		6,95	5,45		1.000.000	450.000		566,0	200,0		20,0	10,0		
24	366	435		34,0	19,0		0,26	0,51		3,60	4,10		49,0	41,0		1,33	0,97		1.320.000	750.000		788,0	400,0		2,13	4,44		
24	426		549	18,0		15,0	0,76		0,29	5,7		6,1	21,0		16,0	0,86		0,63										
48	318		435	39,0		26,0	1,05		0,82	5,7		5,8	21,0		20,0	0,00		0,20										
72	168		279	68,0		53,0	1,96		1,49	5,6		5,7	23,0		21,0	0,07		0,07										
96	114		279	78,0		53,0	1,35		0,00	5,5		5,7	24,0		21,0	0,07		0,00										

Objaśnienie: N = podłoże Kosera wzbogacone w glukozę,

A = " " " " + Fosfodryna o stężeniu 0,008 M.  
 B = " " " " + " " " " 0,007 M.





j) *Wpływ chlorowodoru morfiny na przebieg glikolizy*

Do doświadczenia użyto chlorowodoru morfiny w stężeniu 0,0026 M. Analiza danych liczbowych z tabeli 13: chlorowodorek morfiny w stężeniu 0,0026 M w pierwszych okresach glikolizy (do 9 godzin) niemal całkowicie hamuje szybkość spadku redukcji, oraz bardzo znacznie wzrost bakterii i spadek pH. W końcowym okresie inkubacji szybkość spadku redukcji równa się odpowiednim wielkościom w podłożu normalnym, a szybkość spadku pH przekracza nawet odpowiednią wartość w podłożu normalnym. Odpowiednio do tego wzrasta dość szybko masa bakteryjna.

k) *Wpływ siarczynu sodowego na przebieg glikolizy.*

Siarczyn sodowy w stężeniu 0,003 M dodany do podłoża Kosera spowodował niewielkie wytrącenie się wolnej siarki, co uniemożliwiło oznaczenie ilości komórek bakteryjnych. Pomimo to bezpośrednia ocena optyczna wyglądu i stopnia zmętnienia w tym doświadczeniu nakazywała przypuszczenie, że występuje tu dość znaczny przyrost masy bakteryjnej. Przypuszczenie to potwierdzałby także przebieg zmian pH, którego spadek wzrasta nieproporcjonalnie szybko w stosunku do szybkości spadku redukcji. Tab. 14.

Ogólnie biorąc siarczyn sodowy, jak wynika z załączonej tabeli 14, hamuje znacznie glikolizę, w mniejszym zaś stopniu wpływa na szybkość spadku pH.

l) *Wpływ arseninu sodowego na przebieg glikolizy.*

W doświadczeniu użyto arseninu sodowego w stężeniu 0,005 M. Jak wynika z załączonej tabeli 15, w pierwszej godzinie inkubacji występuje niewielki stosunkowo spadek redukcji, poczym w dalszych godzinach nie obserwuje się już żadnego przyrostu spadku redukcji — zahamowanie staje się kompletne. Również w tym doświadczeniu uderzający jest nieproporcjonalny (jakkolwiek znacznie mniejszy niż w kontrolnej próbie normalnej) spadek pH w stosunku do spadku redukcji, przy jednoczesnym dwukrotnym zwiększeniu masy bakteryjnej.

m) *Wpływ arsenianu sodowego na przebieg glikolizy.*

Arsenian sodowy użyty w stężeniu 0,001 M w pierwszych 4 godzinach inkubacji hamuje całkowicie proces glikolizy, następnie jednak występuje wzrost spadku redukcji, którego szybkość utrzymuje się do końca doświadczenia na jednakowym poziomie.

W dalszych okresach inkubacji przewaga hamowania spadku pH i przyrostu masy bakteryjnej uwydatnia się w większym stopniu, niż hamowanie spadku redukcji. Tab. 16.

n) *Wpływ jonu miedziowego ( $Cu^{++}$ ) na przebieg glikolizy.*

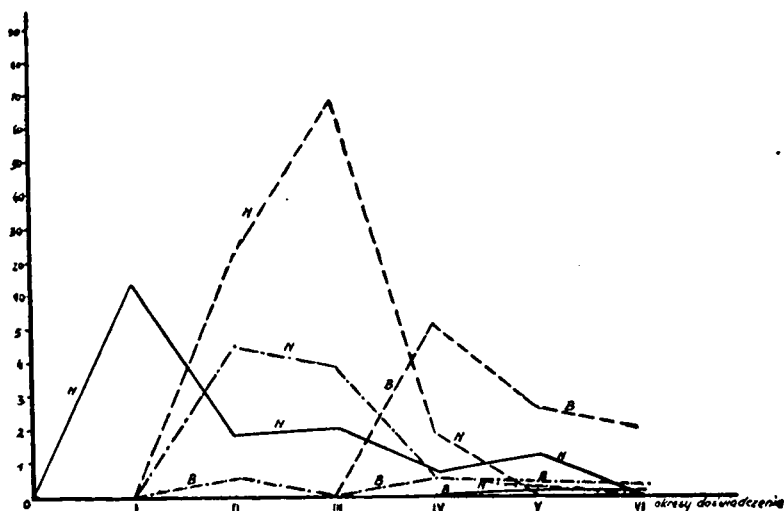
Siarczan miedziowy dodany do podłoża w ilości wystarczającej dla uzyskania stężenia 0,01 M hamuje całkowicie wszelkie objawy metabolizmu *E. coli*.



Siarczan miedziowy w stężeniu 0,001 M w ciągu 9 godzin inkubacji hamuje zupełnie zarówno wzrost bakterii, jak spadek pH i spadek redukcji. Dopiero między 9 i 24 godziną inkubacji występuje niewielki wzrost spadku redukcji, znaczny spadek pH i znaczny wzrost masy bakteryjnej.

Siarczan miedziowy w stężeniu 0,0001 M zachowuje się zupełnie podobnie jak w stężeniu wyżej podanym. Rys. 3.

RYS. 3.



Siarczan miedziowy w stężeniu 0,000001 M hamuje znacznie przebieg glikolizy, ale w wielokrotnie mniejszym stopniu hamuje spadek pH i przyrost masy bakteryjnej, ilość komórek bakteryjnych osiąga pod koniec doświadczenia poziom podłoża normalnego. (Por. wyniki podane w tabelach 17 i 17a.)

#### o) Wpływ aldehydu octowego na przebieg glikolizy.

Aldehyd octowy znajdował się w podłożu Kosera w stężeniu 0,04 M. Jak wynika z danych zawartych w tabeli 18 aldehyd octowy wywiera w stężeniu 0,04 M wpływ hamujący na glikolizę w ciągu całego 24 godzinowego doświadczenia, ale szczególnie wyraźnie zaznacza się to w ciągu pierwszych 9 godzin. Po ustąpieniu tego zahamowania (obejmującego także spadek pH i wzrost masy bakteryjnej) przyrost spadku redukcji jest stosunkowo nieznaczny, natomiast stosunkowo duży jest spadek pH i przyrost masy bakteryjnej.

## 2. Wpływ aktywatorów na przebieg glikolizy.

#### a) Wpływ amidu kwasu nikotynowego na przebieg glikolizy.

Jak wynika z załączonej tabeli 19 amid kwasu nikotynowego w stężeniu 0,0001 M nie wpływa w żaden widoczny sposób na spadek redukcji, spadek pH i wzrost masy bakteryjnej.





TABELA 17a.

Czas inkubacji w godz.	Stężenie glukozy w mg/0/1		Globalny spadek redukcji w 0/1		Szybkość spadku redukcji w 0/1 /godz.		pH		Spadek pH w 0/1		Szybkość spadku pH w 0/1 /godz.		Ilość bakterii w 1 ml.		Wzrost masy bakteryjnej w 0/1		Szybkość wzrostu masy bakt. w 0/1 /godz.								
	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A					
0	525	525	0,0	0,0	0,0	0,0	6,80	6,80	0,0	0,0	0,0	0,0	550.000	550.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
1	462	525	12,0	0,0	0,0	12,0	6,80	6,80	0,0	0,0	0,0	0,0	550.000	550.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
4	438	525	17,0	0,0	0,0	1,73	5,90	6,70	2,0	12,0	4,41	0,49	3,43	550.000	550.000	80,0	0,0	0,0	22,22	0,0	0,0				
9	393	525	498	26,0	6,0	2,05	4,75	6,70	5,0	31,0	2,0	27,0	3,89	1.320.000	550.000	140,0	0,0	20,0	66,66	0,0	4,0				
24	351	525	471	3,0	0,0	11,0	4,30	6,0	4,40	37,0	17,0	36,0	0,39	0,43	0,5	1,65	200,0	80,0	140,0	1,66	5,33	6,26			
36	183	504	471	66,0	4,0	11,0	1,32	0,11	0,0	4,20	5,90	4,30	39,0	14,0	37,0	0,07	0,02	0,06	1.320.000	1.320.000	140,0	140,0	0,0	2,77	0,0
48	183	492	47	66,0	7,0	11,0	0,08	0,04	0,0	4,20	5,20	4,20	39,0	24,0	39,0	0,0	0,24	0,04	1.650.000	1.650.000	200,0	200,0	0,0	2,08	2,08

Objaśnienie: N = podłoże normalne Koseira wzbogacone w glukozę,

A = " " " " " + CuSO<sub>4</sub> o stężeniu 0,0001 M.

B = " " " " " + CuSO<sub>4</sub> o stężeniu 0,000001 M.



b) *Wpływ dodatku zagotowanego wyciągu drożdżowego na przebieg glikolizy.*

Do 100 ml podłoża Kosera dodano 5 ml zagotowanego i przesażonego wyciągu wodnego drożdży piwnych. Wyciąg wodny sporządzono z 2 g suchych drożdży w 10 ml wody destylowanej. Wyciąg drożdżowy miał w tym doświadczeniu zastąpić czystą kozymazę.

Jak widać z załączonej tabeli 20 dodatek zagotowanego wyciągu drożdżowego nie ma żadnego widocznego wpływu na przebieg glikolizy w hodowli *E. coli*.

c) *Wpływ chlorowodoru tiaminy na przebieg glikolizy.*

Do sporządzenia roztworu użyto preparatu farmaceutycznego „Thiamine hydrochloride” F-my Mollenhauer Laboratories, Green Bay, Wisconsin, USA. Przygotowany roztwór zawierał w 1 ml 500  $\gamma$  chlorowodoru tiaminy. Do podłoża Kosera dodano 0,5 ml tego roztworu na 100 ml podłoża.

Jak wynika z załączonej tabeli 21 chlorowodorek tiaminy w stężeniu 250  $\gamma$   $\%$  (czyli M) nie wpływa w żaden widoczny sposób na przebieg glikolizy, zmian pH i przyrostu masy bakteryjnej.

d) *Wpływ insuliny na przebieg glikolizy.*

Do doświadczenia użyto 10 ml insuliny „Lilly”, zawierającej w każdym ml roztworu 20 jednostek.

Dane zamieszczone w tabeli 22 wykazują, że insulina wzmaga natężenie spadku redukcji zwłaszcza w pierwszym okresie inkubacji. Nie ujawnia się żaden wpływ insuliny na przyrost masy bakteryjnej, oraz na spadek pH.

### **III. Oznaczenie estrów fosforowych.**

#### **1. Labilne estry fosforowe (labilny fosforan organiczny).**

Oznaczenie fosforanów nieorganicznych w płynnym podłożu Kosera od początku sprawiało duże trudności: pomimo zastosowania szeregu środków ostrożności w procedurze analitycznej oraz wykonania kilku równoległych oznaczeń w tych samych seriach doświadczeń, błąd doświadczalny był stosunkowo bardzo znaczny, a odchylenia od wartości prób kontrolnych występowały w sposób kapryśny i nieregularny. Średni błąd doświadczalny w końcowym okresie niniejszej pracy wahał się w granicach od 5% do 10%. Z tego względu pod uwagę wzięto tylko końcowe doświadczenia, z pośród których wybrano tylko te dane, w których wartości liczbowe, świadczące o stwierdzeniu obecności labilnego fosforanu organicznego, wykaczały poza granice 10% błędu w sposób zupełnie wyraźny.





Z tego względu, że trudno było w każdym poszczególnym przypadku stwierdzenia obecności labilnego fosforanu, zdecydować od jakiej wartości bezwzględnej, leżącej w granicach błędu doświadczalnego, obliczać stężenie labilnego fosforanu organicznego, podawanie szczegółowych danych liczbowych byłoby bezcelowe.

Podchodząc do tego zagadnienia w sposób wyżej opisany można było wykazać w kilku doświadczeniach obecność labilnego fosforanu organicznego. Zwróciło naszą uwagę to, że labilny fosforan organiczny występował zawsze tylko w próbach kontrolnych, zawierających podłoże Koser normalne (wzbogacone w glukozę), podczas gdy nigdy nie udało się stwierdzić tego związku w podłożach, zawierających inhibitory.

Wydaje się na podstawie zestawienia doświadczeń, w których znaleziono labilny fosforan organiczny, że pojawienie się jego przypada na maximum spadku pH oraz maximum przyrostu masy bakteryjnej, nie pozostaje natomiast w związku z szybkością, ani natężeniem spadku redukcji.

## 5. Inne organiczne estry fosforowe

W ciągu trwania naszej pracy nie udało się ani razu stwierdzić obecności organicznych estrów fosforowych jak: estrów heksozofosforowych, kwasu adenozyotrójfosforowego, kwasu adenilowego, fosfotrioz, kwasu fosfopyrogronowego, kwasu fosfoglicerynowego.

Oznaczenia fosforanów: „prawdziwego“ Fiske-Subbarowskiego, labilnego organicznego, fosforanów po hydrolizie 7, 30 i 60 min., oraz fosforu całkowitego, były przeprowadzone we wszystkich doświadczeniach.

## Omówienie wyników

### I. Udział nieorganicznego fosforanu w przebiegu glikolizy

Wszystkie nasze doświadczenia, przeprowadzane przy zmiennych stężeniach glukozy, fosforanów, zmiennym czasie trwania inkubacji, zmiennym pH oraz różnych ilościach bakterii dodawanych do podłoża, pozornie nie pozwoliły wykazać wymiany pomiędzy komórkami bakteryjnymi *E. coli* i fosforanami nieorganicznymi, znajdującymi się w podłożu. Stwierdzono natomiast że:

1. Obecność fosforanu nieorganicznego jest niezbędnym warunkiem całokształtu metabolizmu *E. coli*. Przy braku fosforanów w podłożu jedynie w pierwszej godzinie inkubacji stwierdzono niewielki spadek redukcji, jak również nieznaczny spadek pH, ale nie stwierdzono żadnego przyrostu masy bakteryjnej w granicach czułości metody nefelometrycznej. W świetle tych spostrzeżeń trudno jest zgodzić się ze zdaniem Clifton'a (43), jakoby kwas adenozyotrójfosforowy i inne związki,

posiadające wiązania fosforowe bogate energetycznie, zawarte w komórce bakteryjnej, miały przeprowadzać fosforylację glukozy bez pobierania fosforanu nieorganicznego z podłoża. Zaznaczona glikoliza w początkowej fazie inkubacji w podłożu bezfosforanowym jest według nas, spowodowana naturalną zawartością fosforanów w komórkach bakteryjnych, wprowadzonych do podłoża, która wystarcza do krótkotrwałej, odbywającej się na niewielką skalę, glikolizy.

2. Zarówno zmniejszenie stężenia fosforanów nieorganicznych w podłożu, jak zwiększenie ich stężenia wywołuje pewne zahamowanie procesu glikolizy. Optymalnym okazało się stężenie fosforanów w podłożu podane w oryginalnym przepisie Koseira (0,014 M).

Hamowanie przemiany węglowodanowej pod wpływem zwiększonych stężeń fosforanu nieorganicznego w podłożu dobrze zgadzałoby się z twierdzeniem Lipman'a, że najsilniejszym inhibitorem dla acetylofosfatazy są jony fosforanowe.

3. Zastosowanie w toku naszej pracy metodyki, umożliwiającej rozpoznanie i oznaczanie labilnych związków fosforowych bogatych energetycznie (acetylofosforan) pozwoliło nam na zmianę poglądu co do pozorowanego bezruchu fosforanu mineralnego, zawartego w podłożu. Jakkolwiek trudno jest nam na podstawie szczupłego materiału doświadczalnego, dotyczącego tej kwestii, wyprowadzić ostateczne wnioski, to jednak zastanawiającym jest, że pojawianie się labilnego fosforanu organicznego przypada nie na okres największego nasilenia glikolizy, lecz na okres maksymalnego spadku pH i maksymalnego przyrostu masy bakteryjnej.

Wyniki naszych doświadczeń pozwalają nam wysnuć dwie alternatywy: albo proces kołowy fosforylacji i defosforylacji odbywa się z taką szybkością, że tylko małe, nie dające się analitycznie uchwycić ilości fosforanu mineralnego wiążą się przejściowo w mechanizmie glikolizy, by w następnym momencie wrócić do obiegu i służyć glikolizie dalszych cząstek glukozy. Według tej interpretacji każda cząstka glukozy podlegałaby mechanizmowi fosforylacyjnemu, natomiast ilość wiążącego się fosforanu mogłaby być niedostępna oznaczeniom analitycznym. Druga alternatywa pozwala przypuszczać, że w komórkach niedezintegrowanych mechanizm fosforylacyjny glukozy nie jest konieczny, natomiast niezbędność fosforanu zaznacza się dopiero w procesach anabolicznych związanych bezpośrednio z wzrostem i pomnażaniem masy komórkowej.

## **II. Wpływ stężenia glukozy na przebieg procesu glikolizy u *E. coli***

Stwierdzono, że trzykrotne zwiększenie stężenia glukozy w podłożu przyspiesza znacznie przebieg glikolizy, w mniejszym zaś stopniu wpływa na szybkość przyrostu masy bakteryjnej.

Widoczne jest, że natężenie procesów anabolicznych pozostaje w zależności od szeregu czynników, nie będących w bezpośrednim związku z rozpadem glukozy.

### **III Znaczenie jonu potasowego w przebiegu glikolizy u *E. coli***

Brak jonu potasowego w podłożu powoduje całkowite zahamowanie metabolizmu *E. coli*, z tym jednak, że w pierwszych godzinach inkubacji pojawia się mały spadek redukcji oraz większy spadek pH, poczym następuje zupełne zahamowanie tych procesów. Przyrostu masy bakteryjnej brak w ciągu całego doświadczenia.

Możnaby myśleć tutaj o trzech możliwościach ;

- a) albo zapas jonów potasowych, zawartych w komórkach *E. coli* jest wystarczający dla utrzymania glikolizy przez pewien czas, ale niewystarczający dla wzrostu i rozmnażania komórek bakteryjnych;
- b) albo jony potasowe nie są potrzebne w procesie glikolizy u *E. coli*, natomiast są niezbędne dla utrzymania wzrostu bakterii.
- c) być może, że zahamowanie wzrostu i jednoczesne gromadzenie się kwaśnych produktów przemiany w nieobecności jonów potasowych, świadczy o toksycznym, samozatrującym przebiegu procesów metabolicznych u *E. coli*.

Brak danych w dostępnej nam literaturze o roli potasu w przemianie węglowodanowej *E. coli*.

### **IV. Znaczenie jonu magnezowego w przebiegu glikolizy u *E. coli***

Brak jonów  $Mg^{++}$  w podłożu nie powoduje całkowitego zatrzymania się glikolizy, chociaż zaznacza się dość wyraźne jej zahamowanie. To samo dotyczy przyrostu masy bakteryjnej, podczas gdy spadek pH jest nieproporcjonalnie duży w porównaniu z podłożem normalnym. Wynika z tego, że jon magnezowy nie jest niezbędnie potrzebny dla przeprowadzenia glikolizy. Zgadza się to z wynikami naszych doświadczeń przy użyciu fluorku sodowego, jako inhibitora.

### **V. Rola inhibitorów przemiany węglowodanowej w przebiegu glikolizy w płynnych hodowlach *E. coli***

Zachowanie daleko idącej ostrożności w wyprowadzaniu wniosków z doświadczeń przeprowadzanych przy użyciu inhibitorów wskazane jest przede wszystkim z tego powodu, że nie znamy idealnie specyficznych inhibitorów. Wyjątek stanowi w/g Krebsa (44) kwas malonowy, jako inhibitor działający wyłącznie na dehydrogenazę bursztynową, jeżeli stosuje się go w małych stężeniach. Krebs pod-



kreśla ponadto w swych rozważaniach na temat kumulacji metabolitów pośrednich, przy zastosowaniu inhibitorów, że nie zawsze można oczekiwać gromadzenia się danego metabolitu.

Zwiększone nagromadzenie się odpowiedniego metabolitu zachodzi bowiem wtedy, kiedy wyrównuje się ubytek prekursora danego metabolitu, spowodowany zahamowaniem reakcji. W niniejszej pracy stosowaliśmy niżej wymienione inhibitory, które ze względu na ich działanie, podzieliliśmy na pięć grup:

1. Inhibitory nie hamujące glikolizy, natomiast hamujące znacznie wzrost bakterii. Do tej grupy zaliczyliśmy fluorek sodowy i kwas jodooctowy.

2. Inhibitory hamujące głównie procesy glikolityczne, w mniejszym zaś stopniu wzrost bakterii. Do tej grupy zaliczyliśmy 2, 4-dwunitrofenol,  $\beta$ -naftylamine, siarczyn sodowy, arsenian sodowy, aldehyd octowy, flozydynę i kwas malonowy.

3. Inhibitory hamujące całkowicie glikolizę i częściowo przyrost masy bakteryjnej. Należy tu arsenin sodowy.

4. Inhibitory hamujące całkowicie glikolizę i nie hamujące przyrostu masy bakteryjnej. Należy tu jon miedziowy.

5. Inhibitory hamujące całkowicie glikolizę i wzrost masy bakteryjnej. Zaliczyliśmy do nich: cjanek potasowy, azydek sodowy i chlorodurek hydroksylaminy.

### **Ad. 1.**

#### *a) Fluorek sodowy.*

Nie jest on inhibitorem specyficznym — jego działanie obejmuje szereg enzymów. Van Potter (45) w swych doświadczeniach nad oksydacyjną fosforylacją w tkankach zwierzęcych wykazał, że fluorek hamuje rozpad ATP, ale nie hamuje syntezy ATP. Glukoza w tych warunkach nie tworzy estru heksozodwufosforowego. Pokrywa się to ze zdaniem Werkmana, Stone'a i Wooda (5). Według Meyerhoffa i Junowicz-Kocholaty'ego (45) fluorek blokuje działanie enolazy tak, że kwas fosfopyrogronowy nie ulega fosforylacji. To hamowanie nie jest całkowite w obecności układu — kwas adenilowy-ATP. Stolz (47) wykazał, że fluorek hamuje tworzenie się kwasu mlekowego, przyczem gromadzi się kwas fosfoglicerynowy. Warburg i Christian (48) udowodnili, że fluorek tworzy z magnezem, zawartym w enolazie, fluorofosforan.

W naszych doświadczeniach fluorki w stężeniach 0,00001 M, 0,02 M i 0,04 M nie hamowały glikolizy, a w mniejszych z wymienionych stężeń wywierały niewielki wpływ aktywujący na przebieg glikolizy u *E. coli*.

Wirth i Nord (49) nie zdołali wykryć tworzenia się kwasu fosfoglicerynowego w obecności fluorków.

Według Barrona i Friedemanna (50) wzrost i zachowanie zdolności fermentowania glukozy u *Propionibacterium pentosaceum* w obecności fluorku może być wyrazem istnienia niefosforylacyjnego mechanizmu glikolizy. Prace te zdają się potwierdzać wyniki, jakie zostały uzyskane w naszych doświadczeniach.

Ponieważ, jak już wspomniano, fluorki hamują między innymi czynność enolazy, na skutek wiązania zawartego w niej magnezu, wynika stąd, że enolaza nie odgrywa większej roli w procesach glikolitycznych u *E. coli*.

Pogląd ten znajduje potwierdzenie w tym, że brak magnezu w podłożu Koserera nie powoduje utraty zdolności fermentacji glukozy u *E. coli*.

Wszystkie nasze doświadczenia, przy zastosowaniu fluorku, wskazują jednoznacznie na to, że schematu Embden-Meyerhoff-Parnasa nie można przenieść bezkrytycznie na procesy dysymilacji glukozy u *E. coli*.

#### b) *Kwas jodooctowy.*

Kwas jodooctowy już w stężeniach 0,0001 M, jak twierdzą Ostern, Baranowski i Terszakowec (51), jest inhibitorem dla procesów oksydoredukcyjnych, związanych z czynnością kozymazy. Główne działanie kwasu jodooctowego polega prawdopodobnie na blokowaniu grup sulfhydrylowych dehydrogenazy fosfogliceraldehydowej. Według Aldous'a (52) wpływ tego inhibitora zależy od pH: poniżej pH 5 jego akcja jest nieodwracalna, powyżej pH 5 — odwracalna. Zjawisko to prowadzi, że toksyczność kwasu jodooctowego wzrasta wraz ze stężeniem jego niezdysoncjowanych cząsteczek.

Clifton (53) wykazał, że kwas jodooctowy w stężeniach większych od 0,0000125 M obniża zużycie tlenu przez bakterie, natomiast w stężeniach od 0,00001 M do 0,00000125 M podwyższa je.

W naszych doświadczeniach kwas jodooctowy w stężeniach 0,0001 M oraz 0,0005 M zupełnie nie hamował normalnej przemiany bakteryjnej, a w stężeniu 0,0001 M zaznaczał się nawet niewielki wpływ aktywujący glikozę, przyrost masy bakteryjnej oraz spadek pH. W stężeniu kwasu jodooctowego 0,0025 M przyrost masy bakteryjnej zostaje całkowicie zahamowany i to samo dotyczy spadku pH, ale nie odnosi się do spadku redukcji, gdyż pomimo braku rozmnażania się bakterii natężenie glikolizy stale wzrasta. Kwas jodooctowy w stężeniu 0,005 M kompletnie zahamowuje wszelkie przejawy metabolizmu bakterii.

Zachowanie się hodowli *E. coli* wobec kwasu jodooctowego w niczym nie przypomina zachowania się drożdży lub przemian mięśniowych, co stanowi jeszcze jeden dowód odrębności mechanizmu glikolitycznego *E. coli*.

**Ad. 2.****a) 2, 4 — dwunitrofenol.**

Clifton (52) i Logan przypisują 2, 4-dwunitrofenolowi działanie hamujące oksydację glukozy, kwasu pyrogronowego, bursztynowego, mlekowego, octowego, fumarowego i glicerolu.

Z naszych doświadczeń wynika, że DNP w stężeniu 0,00006 M wywiera jeszcze wpływ hamujący na przebieg glikozy u *E. coli*, zwłaszcza w początkowym okresie inkubacji. W mniejszym stopniu hamuje spadek pH i prawdopodobnie przyrost masy bakteryjnej. W stężeniu 0,0005 M hamuje całkowicie glikolizę. Rezultaty te potwierdzałyby słuszność poglądu Cliftona.

**b)  $\beta$  — naftylamina.**

Związek ten zastosowano w stężeniu 0,0065 M dla przekonania się, czy zahamowanie glikolizy wystąpi od razu w pierwszym okresie inkubacji (o 1 godzinie), czy też w okresie późniejszym. Jak wiadomo  $\beta$  — naftylamina tworzy z kwasem pyrogronowym nierozpuszczalny związek, a mianowicie kwas  $\alpha$ -metylo- $\beta$ -naftylcynchoninowy.

Przypuszczaliśmy, że możnaby uzyskać pewne wskazówki co do mechanizmu przemiany glukozy w hodowlach bakteryjnych, gdyby stosować związki blokujące określone metabolity pośrednie, notując jednocześnie czas, w jakim ulega zahamowaniu rozpad glukozy. W danym przypadku w ciągu pierwszych 4 godzin inkubacji zahamowanie glikolizy było zupełne, co pozwala domyślać się, że kwas pyrogronowy jest niezbędnym czynnikiem dla zapoczątkowania glikozy u *E. coli*.

**c) Siarczyn sodowy.**

Związku tego użyto dla przekonania się o roli aldehydów, jako pośrednich metabolitów w przebiegu glikozy u *E. coli*. Siarczyn sodowy tworzy z aldehydami, a więc także z aldehydem octowym, związki trudno rozpuszczalne w wodzie. Do doświadczenia użyto siarczynu sodowego w stężeniu 0,003 M i stwierdzono jego niewątpliwy wpływ hamujący na proces rozpadu glukozy, zwłaszcza w ciągu pierwszych godzin inkubacji. Hamowanie przyrostu masy bakteryjnej oraz spadku pH odbywało się w znacznie mniejszym stopniu. Doświadczenie to nie upoważnia do wyciągania wniosków co do roli aldehydu octowego.

**d) Arsenian sodowy.**

O arsenianie wiadomo, że jest inhibitorem tych enzymów, które zawierają grupy sulfhydrylowe. Działa hamująco na fermentację glukozy w stężeniach od 0,01 M do 0,002 M. Użyty w naszych doświadczeniach w stężeniu 0,001 M zahamował całkowicie glikolizę na przeciąg pierwszych 4 godzin inkubacji. Silnie hamował również przyrost masy bakteryjnej i spadek pH.

e) *Florydzyzna.*

W mechanizmie fosforylacyjnym glikolizy florydzyzna gra rolę niespecyficznego inhibitora fosforylasy pod warunkiem, że stężenie florydzyzny przekracza 0,0002 M. Florydzyzna hamuje różne układy enzymatyczne. Reakcja hamowania fosforylacji dotyczy w/g Ruffo'a i Cennamo'a (54) oraz w/g Shapiro'a (55), reakcji oksydoredukcyjnej, sprzężonej z hydrolizą względnie syntezą kwasu adenozynotrójfosforowego. Florydzyzna, prawdopodobnie, nie hamuje przeniesienia fosforanów na układ adenilowy, ani fosforylacji glukozy przez ATP, ale hamuje procesy oksydoredukcyjne, związane z fosforylacją. Inaktywuje układy, dostarczające wiązań bogatych energetycznie. W obecności florydzyzny nie dochodzi do skutku fosforylacja kwasu pyrogronowego i glicerynowego.

W niniejszej pracy florydzynę zastosowano w dwóch stężeniach 0,007 M i 0,008 M. Hamowanie glikolizy było wyraźnie widoczne i zwiększało się w miarę trwania inkubacji, podczas gdy hamowanie przyrostu masy bakteryjnej i spadku pH było słabiej zaznaczone.

f) *Kwas malonowy.*

Rola kwasu malonowego, jako inhibitora, została już omówiona. W naszych doświadczeniach hamował on glikolizę w słabym stopniu, a nie wpływał zupełnie hamująco na przyrost masy bakteryjnej, ani na spadek pH. Mogłoby to świadczyć o małym udziale oksydoredukcyjnego cyklu „cytrynowego“ w przebiegu glikolizy *E. coli*.

g) *Aldehyd octowy.*

Aldehyd octowy jest zaliczany do rzędu ważnych aktywatorów fosforylacyjnej przemiany glukozy, natomiast w naszych doświadczeniach okazał się on w stężeniu 0,04 M inhibitorem zarówno glikolizy, jak i procesów anabolicznych, związanych z wzrostem i rozmnażaniem się bakterii. Wpływ hamujący zmniejsza się jednak w ciągu trwania inkubacji, przyczym stosunkowo szybko narasta masa bakteryjna i spada pH, podczas gdy spadek redukcji jest powolny.

Trudno powiedzieć, czy chodzi tu o hamowanie analogiczne do tego, jakie stwierdzał swego czasu Needham (12) oraz Ashford (56) w komórkach embrionalnych i tkance mózgowej, gdzie 1-gliceraldehyd okazał się specyficznym inhibitorem dla niefosforylacyjnego rozpadu glukozy.

Możnaby również przypuszczać, że duże stężenia aldehydu mogłyby hamować przemianę prekursora, którym jest kwas pyrogronowy.

Potwierdzałyby to nasze przypuszczenie, że mechanizm glikolizy u *E. coli* jest różny od glikolizy w komórkach drożdżowych i mięśniowych.

**Ad. 3.**a) *Arsenin sodowy.*

Arseniny, podobnie, jak arseniany i kwas malonowy, są inhibitorami dla enzymów, zawierających grupy sulfhydrylowe. Stężenia tych związków w granicach 0,01 M do 0,02 M wywoływały zahamowanie fermentacji u szeregu drobnoustrojów.

Stwierdziliśmy na podstawie naszych doświadczeń, że arsenin sodowy w stężeniu 0,005 M powoduje po pierwszej godzinie inkubacji całkowite zahamowanie glikolizy, podczas gdy spadek pH postępował dalej w ciągu całego doświadczenia i występował, jakkolwiek dość słaby, przyrost masy bakteryjnej.

Można przypuszczać, że arseniny hamują nie pierwsze etapy glikolizy u *E. coli*, lecz jedne z dalszych.

**Ad. 4.**a) *Siarczan miedziowy.*

Rola miedzi w metabolizmie bakteryjnym nie jest jeszcze wszechstronnie oświetlona. W większych stężeniach jon miedziowy działa zabójczo na drobnoustroje. W/g Nagana'y i Narayama'y (57) miedź jest wybitnym inhibitorem dla pyrofosfatazy, łącząc się z grupami sulfhydryłowymi i wywołuje całkowite zahamowanie przemiany glukozy w stężeniu 0,00002 M.

Nasze doświadczenia nie dają pogodzić się z tym poglądem, gdyż nie obserwowaliśmy żadnej równoległości pomiędzy działaniem siarczanu miedziowego i działaniem kwasu jodooctowego, który, jak to się przyjmuje ogólnie, również wybitnie blokuje grupy SH — przeciwnie niewiele z pośród stosowanych przez nas inhibitorów wykazuje między sobą tak diametralnie odrębne wpływy, jak kwas jodooctowy i siarczan miedziowy.

Siarczan miedziowy w stężeniu 0,000001 M prawie zupełnie nie hamuje wzrostu masy bakteryjnej i spadku pH, natomiast wydatnie hamuje glikolizę. W stężeniu od 0,0001 M do 0,001 M hamuje w ciągu pierwszych 9 godzin inkubacji zarówno glikolizę, jak i wzrost masy bakteryjnej i spadek pH. Po tym okresie spadek redukcji odbywa się w nieznacznym skali, ale występuje w zamian za to znaczny przyrost masy bakteryjnej i znaczny spadek pH.

Powstaje pytanie, jakie jest źródło energii dla wzmożonych procesów anabolicznych przy nieznacznym nasileniu glikolizy.

**Ad. 5***Cjanek potasowy, azydek sodowy i hydroksylamina.*

Inhibitory typu azydku sodowego i cjanku potasowego działają toksycznie na grupy czynne, zawierające układ żelazo-porfirynowy, jaki

występuje w oksydazach, peroksydazach, katalazie, cytochromach i innych, nie odgrywając poważniejszej roli w procesach fermentacji węglowodanowej, natomiast hamują całkowicie procesy syntezy białek, jak dowodzi Melchior (58). W wysokich stężeniach, np. M/50, osiągnęto hamowanie glikolizy tylko w 50%, a w stężeniach M/200 do M/6000 hamowanie było minimalne. U niektórych gatunków wymoczków cjanek sodowy nie wywierał żadnego wpływu na przebieg fermentacji. Podobnie azydek sodowy wywołuje tylko częściowe zahamowanie procesów fermentacji bez wpływu na mechanizm fosforylacyjny. Zastosowanie hydroksylaminy, jako pośredniego akceptora reakcji, prowadzących do kwasu pyrogronowego poprzez labilne związki acetylofosforowe, do ostatecznych produktów przemiany, wydawało się celowe ze względu na teoretyczną możliwość kumulacji acetylofosforanu.

W naszych doświadczeniach stosowaliśmy cjanek potasowy w stężeniu 0,05 M, azydek sodowy w stężeniu 0,01 M i 0,05 M oraz chlorowodorek hydroksylaminy w stężeniu 0,002 M. We wszystkich wypadkach wynik był jednakowy: całkowite zahamowanie wszelkich objawów metabolizmu *E. coli*.

## **VI. Rola aktywatorów przemiany węglowodanowej w przebiegu glikolizy w płynnych hodowlach *E. coli***

Jako aktywatorów użyto tutaj: amidu kwasu nikotynowego, zgotowanego wyciągu wodnego z drożdży piwnych, chlorowodoru, tiaminy oraz insuliny. Z wymienionych wyżej trzy pierwsze nie wykazały żadnego wpływu aktywującego na przebieg glikolizy, natomiast insulina zwiększała szybkość i nasilenie glikolizy, nie wpływając zresztą aktywująco na przyrost masy bakteryjnej i spadek pH.

Brak aktywującego wpływu amidu kwasu nikotynowego, kozymazy i tiaminy można tłumaczyć zdolnością syntetyzowania tych związków przez *E. coli* lub nieistotnym udziałem tych czynników w procesie glikolizy.

## **VII. Glikoliza a zakwaszenie podłoża**

Z doświadczeń naszych wynika, że spadek pH w hodowli bakteryjnej jest ściślej związany z procesami anabolicznymi, biorącymi udział w rozmnażaniu i wzroście *E. coli*, niż z katabolicznymi przemianami glukozy.

## Streszczenie

1. Przeprowadzono studia na mechanizmem przemiany glukozy w płynnych hodowlach *E. coli*.

Według naszego poglądu badania wykonywane na bezkomórkowych wyciągach bakteryjnych nie mogą dać pełnego i pewnego obrazu fizjologicznych przemian drobnoustrojów.

2. Ogólnie przyjęty schemat mechanizmu glikolizy w/g E m b d e n a — Meyerhoffa — Parnasa nie znalazł potwierdzenia w naszych doświadczeniach.

Kwas jodoctowy w stężeniach 0,0001 M do 0,0025 M zupełnie nie hamował glikolizy. Fluorek sodowy w stężeniach od 0,00001 M do 0,04 M również nie hamował glikolizy. Oba te inhibitory w stężeniach 0,00001 M wykazywały nawet wpływ aktywujący glikolizę.

Rola enolazy w mechanizmie glikolizy u *E. coli* nie jest istotna, jak to wynika z doświadczeń z fluorkami i na podłożu, pozbawionym magnezu.

Amid kwasu nikotynowego ani kozymaza nie wywierały żadnego wpływu aktywującego na przebieg glikolizy. Aldehyd octowy w stężeniu 0,04 M jest inhibitorem, a nie aktywatorem glikolizy u *E. coli*.

Stwierdzono niezbędność fosforanów dla wzrostu i metabolizmu *E. coli*.

3. W kilku doświadczeniach udało się wykazać obecność labilnego fosforanu organicznego (acetylofosforan Lipmanna) w hodowli bakteryjnej.

Nie udało się natomiast stwierdzić ubytku fosforanów nieorganicznych w podłożu, który możnaby odnieść do tworzenia się trwałych estrów heksozofosforowych i ATP we wnętrzu komórek *E. coli*. Mogłoby to przemawiać za niefosforylacyjnym rozpadem glukozy.

4. Stwierdzono niezbędność jonów potasowych dla całokształtu metabolizmu *E. coli*.

5. Siarczan miedziowy w stężeniu  $10^{-6}$  M jest wybitnym inhibitorem procesów glikolitycznych, natomiast nie hamuje wzrostu masy bakteryjnej

6. Wydaje się, że zakwaszenie podłoża w toku inkubacji *E. coli* zależy mniej od natężenia procesów anabolicznych, związanych z przyrostem masy bakteryjnej, niż od procesów glikolitycznych.

## OBJAŚNIENIA DO RYSUNKÓW

### Objaśnienie rys. 1.

- N     === szybkość spadku redukcji w ‰/godz. w pożywce normalnej wg. tabeli 7.
- — — — N     === szybkość przyrostu masy bakteryjnej w ‰/godz. w pożywce normalnej wg. tabeli 7.
- · · · · N     === szybkość spadku pH w ‰/godz. w pożywce normalnej w tabeli 7.
- B     === szybkość spadku redukcji w ‰/godz. w pożywce z dodatkiem NaF w stężeniu 0,1 M (w tabeli 7 odnośne dane znajdują się w kolumnie oznaczonej literą A).
- — — — B     === szybkość przyrostu masy bakteryjnej w ‰/godz. w pożywce z dodatkiem NaF w stężeniu 0,1 M.
- · · · · B     === szybkość spadku pH w ‰/godz. w pożywce z dodatkiem NaF w stężeniu 0,1 M.

### Objaśnienie rys. 2.

- N     === szybkość spadku redukcji w ‰/godz. w pożywce normalnej wg. tabeli 8a.
- — — — N     === szybkość przyrostu masy bakteryjnej w ‰/godz. w pożywce normalnej wg. tabeli 8a.
- · · · · N     === szybkość spadku pH w ‰/godz. w pożywce normalnej wg. tabeli 8a.
- B     === szybkość spadku redukcji w ‰/godz. w pożywce z dodatkiem kwasu jodooctowego w stężeniu 0,0025 M.
- — — — B     === szybkość przyrostu masy bakteryjnej w ‰/godz. w pożywce z dodatkiem kwasu jodooctowego w stężeniu 0,0025 M.
- · · · · B     === szybkość spadku pH w ‰/godz. w pożywce z dodatkiem kwasu jodooctowego w stężeniu 0,0025 M.

U w a g a : krzywe oznaczone literą B przedstawiają wykres graficzny wartości liczbowych z kolumny A tabeli 8a.

### Objaśnienie rys. 3.

- N     === szybkość spadku redukcji w ‰/godz. w pożywce normalnej wg. tabeli 17a.
- — — — N     === szybkość przyrostu masy bakteryjnej w ‰/godz. w pożywce normalnej wg. tabeli 17a.
- · · · · N     === szybkość spadku pH w ‰/godz. w pożywce normalnej wg. tabeli 17a.
- B     === szybkość spadku redukcji w ‰/godz. w pożywce zawierającej 0,00001 M  $\text{CuSO}_4$  wg. tabeli 17a.
- — — — B     === szybkość przyrostu masy bakteryjnej w ‰/godz. w pożywce zawierającej 0,000001 M  $\text{CuSO}_4$  wg. tabeli 17a.
- · · · · B     === szybkość spadku pH w ‰/godz. w pożywce zawierającej 0,00001 M  $\text{CuSO}_4$  wg. tabeli 17a.



## PIŚMIENNICTWO

- 1) Harden A. (1932), „Alcoholic Fermentation“.
- 2) Harden A., Walpole G. S. (1936), Proc. Roy. Soc. B. 77(309).
- 3) Antoniani C. (1943), Biochem. Z., 267 (376).
- 4) Tikka J. (1935), Biochem. Z., 279 (264).
- 5) Werkman C. H., Stone R. W., Wood U. G. (1937), Enzymologia, 4 (24).
- 6) Endo S. (1938), Biochem. Z., 296 (57).
- 7) Still J. (1940), Biochem. J., 34 (1374).
- 8) Neuberg C., Kobel (1934).
- 9) Utter M. F., Werkman C. H., (1944), Arch. Biochem., 5 (413).
- 10) Le Page E. A., Umbreit W. W. (1943), J. Biol. Chem., 147.
- 11) Barron E. S. W. (1943), Adv. Enzymol., III, (149)
- 12) Needham J., Lehmann H., (1937), Biochem. J., 31/1210, 1913.
- 13) Needham J., Nowiński W. W., Dixon K. C., Cock R. P., (1937),  
Biochem. J., 31/118/1185.
14. Needham J, Nowiński W. W., (1937), Biochem. J., 31/1165.
- 15) Meyerhoff O., Perdigon E., (1940, Enzymologia, 9 (353).
- 16) Mann T. J., Quastel J. H., (1941), Biochem. J., 35 (562).
- 17) MacFarlane M. G., Weil-Malherbe, (1941). Biochem. J. 35 (1).
- 18) Dammann E., Rotini O. T., Nord F. F., (1938), Biochem. Z. 297 (185).
- 19) Dammann E., (1938), Berichte 71 (1865).
- 20) O'Connor R. C., (1940), Biochem. J. 34 (1008).
- 21) Nord F. F., (1939), Erg. Enzym. Forschung. 8 (149).
- 22) MacFarlane M. G., (1939), Biochem. J., 505.
- 23) Nilsson R., Alm F., (1940). Biochem. Z., 304 (285).
- 24) Barron E. S. G., (1943), Adv. Enzymol., III (156).
- 25) Lipmann F., (1946), Adv. Enzymol., VI. (230).
- 26) Lipmann F., (1946), Adv. Enzymol., VI (99).
- 27) Lipmann F., Tuttle L. C., (1941), J. Biol. Chem., 153 (571).
- 28) Lipmann F., Tuttle L. C., (1945), J. Biol. Chem. 159 (21).
- 29) Koepsell H. J., Johnson M. J., (1942), J. Biol. Chem., 145 (379).
- 30) Koepsell H. J., Johnson M. J., (1944), J. Biol. Chem., 145 (379).
- 31) Kalmitz, Werkman C. H., (1943), Arch. Biochem., 2, (113).
- 32) Utter M. F., Werkman C. H., (1942), Biochem. J., 36 (485).
- 33) Utter M. F., Werkman C. H., Lipmann F., (1944), J. Biol. Chem.  
154 (723).
- 34) Utter U. F., Krampitz, Werkman C. H. (1944), J. Bact., 47 (412).
- 35) Banga J., Ochoa S., Peters R. A., (1939), Biochem. J., 33 (1980).
- 36) Ochoa S., (1941), J. Biol. Chem., 138 (751).
- 37) Lipmann F., Tuttle L. C., (1945).
- 38) Sachs, (1941), J. Physiol. Rev, 21 (217).
- 39) Koser S. A., (1923), J. Bact., 8, (493 - 520).
- 40) McFarland, (1944), Laboratory Methods of the United States Army, (405).
- 41) Hagedorn, Jensen, (1923), Biochem. Z., 135/48, 137/92.
- 42) Bodansky, (1933), J. Biol. Chem. 101 (93).
- 43) Clifton C. E., (1943), prace niepublikowane, wzmianka w Adv. Enzy-  
mol. VI (269).
- 44) Krebs H. A., (1943), Adv. Enzymol. III (191).
- 45) Van Potter R., (1947), J. Biol. Chem., 169, I (17).
- 46) Meyerhoff O., Junowicz-Kocholaty R., (1944), J. Biol. Chem. 145.

- 47) Stolz E., (1945), *Adv. Enzymol.* V (32).  
 48) Warburg O., Christian W., (1939), *Biochem. Z.*, 303 (40).  
 49) Wirth J. C., Nord F. F., (1943), *Arch. Biochem.*, 1 (143).  
 50) Barron E. S. G., Friedemann T. E., (1941), *J. Biol. Chem.*, 137 (593).  
 51) Ostern P., Baranowski T., Terszakowec J., (1938) *Z. Physiol. Chem.*, 251 (258).  
 52) Aldous J. G. (1948), *J. Biol. Chem.* 176.  
 53) Clifton, (1946), *Adv. Enzymol.* VI.  
 54) Ruffo A., Cennamo C., (1946), *Arch. di Sc. Biol.*, 31,3 (127). *Exc. Med. S. III* 1948).  
 55) Shapiro B., (1947), *Biochem. J.*, 41/2.  
 56) Ashford C. A., (1934), *Biochem. J.*, 28 (2229)  
 57) Naganna B., Narayana V. K., (1948), *J. Biol. Chem.*, 174 (500).  
 58) Melchior J. B., (1948), *J. Biol. Chem.* 174,

## S U M M A R Y

1. Studies have been conducted on the mechanism of glucose metabolism of *Escherichia coli* growing in a liquid medium. The medium (according to Koser) had following composition: glucose - 2,0 g,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  - 1,0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,0 g, NaCl - 5,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  - 0,2 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1000 ml.

Determinations of glucose (by the method of Hagedorn and Jensen), inorganic and ester phosphates (by the method of Fiske - Subbarow), labile phosphate compounds (by the method of Lipmann), pH (electrometrically) as well as the number of bacterial cells (by the modified nephelometric method of Mc Farland) have been performed.

All determinations — except pH measures and bacterial mass increase — have been made on the liquid medium after the bacterial cells were removed.

The culture samples were always taken at defined incubation stages. Series of Erlenmeyer test flasks inoculated with equal amount of *E. coli* were incubated at 37°C while non-inoculated ones served as control.

2. The author's aim was to gain picture of mechanism of the glycolysis in living cells of *E. coli*. Investigations performed on cells-free bacterial extracts cannot, according to the authors, give a close conception concerning the glycolysis under physiological conditions of living bacteria.

3. It has been stated:

a) The presence of inorganic phosphates in medium is an indispensable condition for the growth of *E. coli* and its ability to the breaking down of carbohydrates. This is contrary to Clifton who claims that ATP and

other energy rich phosphate esters, contained in bacterial cells are capable to perform phosphorolysis of glucose in the absence of any inorganic phosphates without.

b) In several cases of the decrease in content of inorganic phosphates in the medium the authors did not succeed to prove the presence neither of ATP nor of stable hexosophosphate esters.

c) In a number of experiments the presence of a labile organic phosphate (Lipmann's acetylphosphate) has been shown.

d) The inhibition of glycolysis occurred both in the event of decrease and increase in the concentration of inorganic phosphates. The concentrations given by Koser (0,014 M  $PO_4^{''}$ ) proved to be optimal. This is in accord with Lipmann's opinion that the phosphate ions are the strongest inhibitors for the acetylphosphatase.

e) It seems possible that the acetylphosphate appears in medium when the velocity of pH decrease and the velocity of bacterial mass increase reach their maximal value, but not when the glycolytic activity is maximal.

f) Potassium ions have been proved to be indispensable for the growth and metabolism of *E. coli*.

g) The absence of Mg-ions in the medium did not cause complete inhibition of the growth and glycolytic processes, but only slight diminution of the intensity in the course of the breakdown of glucose.

h) Iodoacetic acid in conc. of 0,0001 M — 0,0025 M exerted relatively strong inhibitory effect on the growth of bacteria, but it did not inhibit the glycolysis in these concentrations. In concentration of 0,00001 M the glycolysis was rather stimulated.

i) Fluoride in conc. 0,00001 M — 0,02 M stimulated the fermentation of glucose. In concentration of 0,04 M it inhibited the bacterial mass increase but did not exert its inhibitory influence on the glycolysis.

j) 2, 4-dinitrophenol in conc. of 0,00006 M still inhibited the glycolysis especially in the early incubation periods. However, it does completely inhibit in conc. of 0,0005 M.

k)  $\beta$  — naphthylamine employed in conc. 0,0065 M possesses an inhibitory property during the first four hours of incubation; its influence gradually diminishes.

l). Na-arsenite used in conc. 0,005 M after one hour of incubation completely inhibited the glycolysis, but it acted at a smaller degree on the bacterial mass increase and the decrease of pH.

m) Na-sulfite used in conc. 0,003 M distinctly inhibited the glycolytic processes, mostly the first incubation hours.

n) Na-arsenate employed in conc. 0,001 M inhibited glycolysis during the first four hours of incubation completely. It also had a strong inhibitory influence on the bacterial mass increase and the decrease of pH.

o) Phlorizine present in the medium in conc. of 0,007 M and 0,008 M was found to inhibit glycolysis while its influence on bacterial mass and pH value was only slight.

p) Malonate used in conc. of 0,001 M proved to be only a slight glycolysis inhibitor; the bacterial mass inhibition as well as pH decrease was not observed at all

q) Acetaldehyd in conc. 0,04 M appeared to be in the initial stage an inhibitor of the glycolysis and anabolytic processes, connected with the multiplication and the growth of bacteria. In the later phase its influence on the reduction rate slowly diminished while the bacterial mass quickly increased.

r) Cupric sulfate in conc. 0,0001 — 0,001 M inhibited in the first nine incubation hours the glycolysis and bacterial mass increase as well as pH decrease. In conc. of 0,000001 M  $\text{CuSO}_4$  only slightly influenced the bacterial mass increase and the pH decrease but distinctly inhibited the breakdown of glucose.

s) Symptoms of the metabolism of *E. coli* were in our experiments with cyanide, azide and hydroxylamine hydrochloride in conc. corresp. 0,05 M, 0,01 M, 0,05 M (the last compound also in conc. 0,002 M) in all cases completely inhibited.

t) Among activators which in our experiments did not activate the glycolysis were: nicotinic acid amide in conc. 0,0001 M, yeast extract containing small amounts of cozymase and thiamine hydrochloride in conc. 250 micrograms per cent.

u) Insuline in conc. 200 units in 100 ml of the medium only slightly activated glycolysis.

4. On the basis of the performed investigations the authors conclude:

a) Experiments with fluoride and the medium without Mg-ions prove that the enolase does not play any essential rôle in the glycolysis mechanism of living cells of *E. coli*.

b) That is a disagreement with the scheme according to Embden — Meyerhoff — Parnas concerning the glycolysis mechanism in living cells of *E. coli*.

c) The inhibitors such as fluoride, iodoacetate — in concentration used by us — inhibit rather anabolytic processes, directly connected with the bacterial growth, than the glycolysis.

d) Cupric sulfate in small concentrations represents almost an ideal inhibitor of glycolysis of *E. coli* because it does not interfere with anabolytic processes connected with bacterial growth.

e) It seems possible that the acidifying of the medium during incubation depends more on the intensity of anabolytic processes (as regards bacterial mass increase), than on the glycolysis rate.

f) It seems likely that the glucose breakdown in living cells of *E. coli* could occur at least on two or three different pathways.

Discrepancy between results of the experiments carried out on bacterial extracts and those obtained from investigations on intact cells could be referred to to the desintegration of cells. It appears the under these conditions certain enzyme systems are inhibited, other stimulated and may be some new reactions, formerly not present, take place.



