Powiązanie anabolizmu z katabolizmem u *Pseudomonas extorquens* Bassalik

*The Relationship between Anabolism and Katabolism
in Pseudomonas extorquens Bassalik*

L. JANOTA

W 1913 r. ukazała się w „Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik“ praca Bassalika (1913) na temat bakterii rozkładających kwas szczawiowy. W pracy tej została wyjaśniona kwestia mineralizacji kwasu szczawiowego w glebie. W wyniku badań nad możliwością rozkładu szczawianów przez 90 różnych mikroorganizmów Bassalik stwierdził, że jedynie wyizolowany przez niego z odchodów dżdżownicy *Bacillus extorquens*, rozkładał szczawiany szybko i zupełnie. Przy rozkładzie tym, który jak wykazał Bassalik, katalizowany jest przez ektoenzym, nie powstawały jako produkty uboczne ani kwasy tłuszczowe, ani alkohole, ani aldehydy. Z produktów gazowych rozkładu wykrył Bassalik jedynie dwutlenek węgla, natomiast nie wykrył tlenu węgla ani metanu. Bassalik wykonał również pomiary pochłanianego tlenu i wydzielanego dwutlenku węgla przez *B. extorquens* w czasie rozkładu szczawianów i na tej podstawie ułożył bilans energetyczny i węglowy. Stwierdził on, że ilość rozkładanego szczawianu wystarcza na pokrycie energetycznego zapotrzebowania bakterii. Ilość zużytego tlenu odpowiada ilości potrzebnej teoretycznie do utlenienia kwasu szczawiowego, natomiast ilość wydzielonego dwutlenku węgla jest dwukrotnie mniejsza niż wynikająca z równania:

Celem wyjaśnienia procesu syntezy materiałów komórkowych *B. extorquens*, Bassalik zbadał wzrost tych bakterii na pożywkach zawierających różne źródła węgla. Okazało się, że prócz kwasu szczawiowego źródłem węgla może być kwas malonowy, bursztynowy, oksaminowy, oksamid, kwas mezoksalowy, glioksalowy, formaldehyd, alkohol metylowy i etylowy, gliceryna, glukoza, rozcieńczony fenol, mocznik, alloksan. Brak natomiast było wzrostu na kwasie octowym.

Bassalik wziął pod uwagę trzy możliwe drogi przemian, którym ulega kwas szczawiowy:

- 1) redukcja kwasu szczawiowego do gliksalowego
- 2) rozpad kwasu szczawiowego na kwas mrówkowy i dwutlenek węgla
- 3) utlenienie kwasu szczawiowego z wytworzeniem dwutlenku węgla, który następnie zostanie zredukowany.

Omawiając powyższe hipotezy Bassalik stwierdził, że za redukcją kwasu szczawiowego do gliksalowego przemawia dobry wzrost i szybkie rozmnażanie *B. extorquens* na kwasie gliksalowym. Hipoteza druga jest najsłabsza, ze względu na to, że *B. extorquens* rośnie gorzej na mrówczanie niż na szczawianie. Gdyby hipoteza trzecia była słuszna, metabolizm *B. extorquens*, organizmu rozkładającego sole kwasu szczawiowego, byłby podobny do metabolizmu bakterii autotroficznych, jak np. utleniających amoniak, siarkowodór itp., w tym sensie, że energia jest otrzymywana z utleniania prostego związku organicznego, jakim jest kwas szczawiowy, a nie z jakiegoś związku nieorganicznego, podczas gdy w procesach syntezy użytkowany jest węgiel pochodzący z redukcji dwutlenku węgla.

W 1948 r. Bhat i Barker H. A. opublikowali pracę o wyizolowaniu nowej bakterii rozkładającej szczawiany, *Vibrio oxaliticus*. Znowu wysunęli oni zagadnienie wiązania dwutlenku węgla przez bakterie kwasu szczawiowego, ale zagadnienia tego nie rozwiązali. W 1948 r. zostały wyizolowane przez autorkę (Janota 1950) bakterie rozkładające szczawiany. Bakterie te okazały się identyczne pod względem morfologicznym i fizjologicznym z bakteriami wyizolowanymi i zbadanymi przez Bassalika. (W okresie, gdy Bassalik wyizolował i badał te mikroorganizmy, brak było ustalonej ogólnie przyjętej systematyki. W pracy swej Bassalik podawał, że według Fischera bakterie te powinny być zaliczone do *Bactrinium*, według Miguli do *Pseudomonas*, ale wobec panującego chaosu w systematyce można nazwać je po prostu *Bacillus*. Ja używam jednak nazwy rodzajowej *Pseudomonas*, jako zgodnej z obecnie przyjętą nomenklaturą Bergey a).

W pierwszym okresie badań nad *Pseudomonas extorquens*, tzn. w roku 1948/49 określiłam zużywanie kwasu szczawiowego przez te bakterie w zależności od ilości szczepionego materiału. Pozostawała jednak w dalszym ciągu nie sprawdzona nowszymi metodami, niezwykle ciekawa hipoteza Bassalika, czy *Ps. extorquens* zdolna jest do wiązania dwutlenku węgla kosztem energii uzyskanej ze szczawianu jako jedyne źródła węgla dodawanego do pożywki. Stwierdzenie, że jakiś organizm korzystający ze związku organicznego, zużywający ten związek, zdolny jest do wiązania dwutlenku węgla, możliwe jest albo przez stosowanie techniki izotopowej, albo przez bardzo dokładną analizę gazową. Nie mając możliwości zastosowania techniki izotopowej w pracy niniejszej, której celem było

kontynuowanie badań nad metabolizmem *Ps. extorquens*, ograniczyłam się do pomiarów gazowych metodą Warburga. Jednym z podstawowych założeń pracy było przyjęcie ścisłego powiązania między procesami katabolicznymi i anabolicznymi, gdyż łańcuchy reakcji prowadzące do syntezy materiału komórkowego rozpoczynają się od pewnych stadiów procesów dysymilacyjnych.

Twierdzenie to podkreślone przez van Niela w 1940 r. było oparte na wynikach prac szeregu badaczy, między innymi H. A. Barkera (1936), Giesbergera (1936) i Cliftona (1937). H. A. Barker badał utlenianie szeregu związków organicznych przez *Prototheca zopfii*. Potwierdził on na podstawie pomiarów manometrycznych, że nie ma proporcjonalności między ilością tlenu pobieranego w doświadczeniu, a ilością potrzebną do całkowitego spalania danego związku, wyliczoną teoretycznie. Barker postawił hipotezę, że związek utleniany przez *P. zopfii* nie ulega całkowitemu spalaniu, lecz część pośrednich produktów utleniania jest wykorzystana w procesie asymilacji.

Hipoteza Barkera została potwierdzona przez badania Giesbergera nad utlenianiem związków organicznych przez różne gatunki *Spirillum* i badania Cliftona nad utlenianiem również związków organicznych przez *Pseudomonas calco-acetica* i *Escherichia coli*.

Clifton starał się doprowadzić do całkowitego spalania kwasu octowego przez *Ps. calco-acetica* blokując różnymi truciznami komórkowymi procesy asymilacji. Wyniki jego badań były następujące:

- 1) fluorek sodu w stężeniu M/100 nie ma wpływu na utlenianie,
- 2) cyjanek potasu w stężeniu M/800 działa hamująco na intensywność pobierania tlenu, działanie to zmniejsza się z czasem,
- 3) jodooctan w stężeniu większym niż M/80000 zmniejsza intensywność pobierania tlenu,
- 4) jodooctan w stężeniu M/10000 do M/70000, azydek sodu w stężeniu M/600 do M/1000 i 2,4 dwunitrofenol w stężeniu M/4000 do M/8000 zwiększają zużycie tlenu do 90% ilości potrzebnej do zupełnego spalania octanu.

Te same trucizny komórkowe wpływają hamująco zarówno na procesy syntezy, jak i na procesy oddychania, jednakże niskie stężenia trucizn hamują oddychanie słabiej niż syntezę. Wpływ czynnika hamującego na pobieranie tlenu zależy nie tylko od utlenianego związku, lecz również od gatunku, a nawet od odmiany badanego organizmu.

Autorzy wyżej przytoczonych prac nie identyfikowali pośrednich produktów utleniania wchodzących później do syntezy. Stwierdzili tylko ich istnienie, opierając się między innymi na wynikach pomiarów manometrycznych wykazujących niezupełne utlenienie substratu oraz zwiększenie całkowitej ilości pobieranego tlenu przy zahamowaniu procesu syntezy.

Interpretację działania trucizn takich, jak 2,4 — dwunitrofenol (DNP), azydki, wodzian chloralu, gramicydyna, toksyna dyfterytyczna, podali po raz pierwszy Lardy i Elvehjem (1945). Autorzy ci wysunęli hipotezę, że związki powyższe, które hamują użytkowanie energii oddychania lub glikolizy, wstrzymują powstawanie wysokoenergetycznych związków fosforowych. Wpływ pobudzający tych ciał na glikolizę i oddychanie tłumaczy autorzy tym, że odpada zależność tych procesów od dopływu nieorganicznego fosforanu i ADP, które normalnie stanowią czynnik ograniczający szybkość glikolizy.

Przed oddaniem niniejszej pracy do druku jeszcze jeden raz zostały wyizolowane bakterie rozkładające szczawiany.

W 1953 r. J a y a s u r i y a (1954) referował pracę na zjeździe mikrobiologów brytyjskich na temat wyizolowania z ziemi bakterii rozkładających kwas szczawiowy różniących się pod względem pewnych cech fizjologicznych od *Pseudomonas extorquens* i *Vibrio oxaliticus*. J a y a s u r i y a podał omyłkowo, że bakterie wyizolowane przez autorkę, zostały nazwane *Ps. oxaliticus* i różnią się od *Bacillus extorquens* wyizolowanego przez B a s s a l i k a. Optymalne stężenie szczawianu potasu dla bakterii wyizolowanych przez J a y a s u r i y a wynosi 0,8 do 1⁰‰, jest więc blisko dziesięciokrotnie większe niż dla *Ps. extorquens*, dla którego optymalne stężenie szczawianu wynosi 0,12⁰‰. Jednakże na podstawie pomiarów wymiany gazowej J a y a s u r i y a stwierdził, że badane przez niego bakterie utleniają tylko 10‰ podanego szczawianu. Są one zdolne również do utleniania kwasu bursztynowego, fumarowego, jabłkowego, pyrogronowego, mlekowego, octowego, mrówkowego. Zdolności utleniające komórek zależne są od pożywki, na której bakterie wyrosły. Kwas monofluorooctowy w stężeniu 0,001M hamuje utlenianie kwasu szczawiowego w 55⁰‰.

METODY

Oznaczanie pobierania tlenu oraz wydzielania dwutlenku węgla przez bakterie *Pseudomonas extorquens* przeprowadzono metodą bezpośrednią Warburga według opracowania U m b r e i t a i wsp. (1948).

Bakterie, których oddychanie badano w pożywce zawierającej szczawian amonu jako jedyne źródło węgla, hodowano w pożywce płynnej, zawierającej w 1 litrze wody destylowanej:

Pożywka A	K_2HPO_4	— 0,5 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,1 g
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,02 g
	NaCl	— 0,3 g
	$(COO)_2(NH_4)_2$	— 1,2 g

Bakterie, których oddychanie badano w pożywce z glukozą, hodowano w pożywce płynnej zawierającej w 1 litrze wody destylowanej:

Pożywka B	ekstrakt mięsny	— 3 g
	pepton	— 5 g
	glukoza	— 20 g

(pH pożywek wynosiło ok. 7)

Hodowlę prowadzono w temperaturze 27°C przez 11 — 12 dni. W miarę alkalizowania pożywki ze szczawianem amonu dodawano do niej kwasu szczawiowego do zobojętnienia. Po 11 — 12 dniach bakterie odwirowywano, przemywano dwukrotnie wodą destylowaną i pozostawiano w wodzie destylowanej w temp. około 0°C przez 24 godziny. Po 24 godzinach bakterie przemywano po raz trzeci wodą destylowaną, odwirowywano, mokrą masę wkładano do naczynka Warburga, gdzie suszono je w próżni w temp. pokojowej.

Do pomiarów starano się używać jak najbardziej zbliżone ilości bakterii, a wszystkie otrzymane wyniki przeliczano na 10 mg suchej masy. Pożywki stosowane do pomiarów były identyczne z pożywkami, w których prowadzono hodowlę, przygotowano je w ilościach 2 ml na jedno naczynko Warburga. Do pochłaniania dwutlenku węgla stosowano 0,2 ml 20% KOH. Temperatura pomiarów wynosiła 27°.

Bakterie hodowano również w pożywkach nie zawierających organicznych związków węgla. Skład tych pożywek był następujący:

Pożywka C	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	— 0,5 ‰
	NaHCO_3	— 0,1 ‰
	K_2HPO_4	— 0,02‰
	MgCl_2	— 0,01‰
	NH_4Cl	— 0,04‰
	ślady żelaza	
	pH ok. 8	
Pożywka D	NaHCO_3	— 0,1 ‰
	K_2HPO_4	— 0,05‰
	NH_4Cl	— 0,04‰
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	— 0,01‰
	ślady żelaza	
	pH ok. 7	
Pożywka E	NaCl	— 0,03‰
	K_2HPO_4	— 0,05‰
	NH_4Cl	— 0,04‰
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	— 0,01‰
	ślady żelaza	
	pH ok. 7	

Do wszystkich trzech pożywek używano wodę podwójnie destylowaną oraz odczynniki chemicznie czyste. Hodowlę prowadzono w temp. 27°C. Azotyny i azotany wykrywano za pomocą reakcji barwnej z dwufenyloaminą w stężonym kwasie siarkowym. Zużycie amoniaku określano kolorymetrycznie (jakościowo) odczynnikiem Nesslera. Oznaczanie tiosiarczanów przeprowadzono za pomocą miareczkowania 0,01 n roztworem jodu.

BADANIA WYMIANY GAZOWEJ

Oznaczanie współczynnika oddechowego Ps. extorquens w pożywce ze szczawianem amonu

Pomiar wymiany gazowej bakterii znajdujących się w pożywce ze szczawianem amonu trwał 8 godzin, odczyty manometryczne dokonywano co 30 minut. Stwierdzono, że w ciągu całego doświadczenia 10 mg suchej masy bakterii pobrało 183,9 μl O_2 , wydzieliło 104,4 μl CO_2 . Wartości współczynnika oddechowego wzrastały od 0,28 do 0,61 (tabela 1). Bakterie utleniają nie tylko kwas szczawiowy, ale również substancje komórkowe oraz produkty autolizy komórek martwych. Otrzymane ilości pobranych mikrolitrów tlenu oraz wydzielonych mikrolitrów dwutlenku węgla są ilościami wypadkowymi procesu utleniania kwasu szczawiowego i utleniania wyżej wymienionych, nieokreślonych co do jakości i ilości składników komórkowych. Aby otrzymać te ilości gazów, które rzeczywiście odpowiadałyby utlenianiu samego kwasu szczawiowego, należy określić ilości gazów pobieranych i wydzielanych, gdy bakterie znajdują się w wodzie destylowanej. Przeprowadzono doświadczenie, w którym oznaczono ilość pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się w wodzie destylowanej. Wyniki przedstawiono w tabeli 2. Stwierdzono, że w ciągu 8 godzin 10 mg suchej masy bakterii pobrało 100,2 μl O_2 , wydzieliło 41,2 μl CO_2 . Są to dość znaczne ilości oznaczonych gazów w porównaniu z ilościami przedstawionymi w tabeli 1. Poza tym przez pierwsze 2 godziny 30 minut dwutlenek węgla był pobierany przez bakterie, a nie wydzielany. Dopiero po tym czasie rozpoczęło się wydzielanie CO_2 i współczynnik oddechowy zaczął wzrastać od wartości 0,04 do wartości 0,41 po 8 godzinach doświadczenia.

Dla stwierdzenia, jakie ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla są związane z samym utlenianiem kwasu szczawiowego, od ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla w pożywce ze szczawianem odjęto ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się w wodzie destylowanej. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 3.

Wyliczono, że w okresie ośmiu godzin 10 mg suchej masy bakterii pobrało 83,7 μl O_2 , wydzieliło 63,2 μl CO_2 . W pierwszych dwóch godzinach doświadczenia wartość współczynnika oddechowego wynosiła około 2, po ośmiu godzinach spadła do 0,76.

Pobieranie dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się w wodzie destylowanej można by wytłumaczyć w następujący sposób. *Pseudomonas extorquens* są zdolne do redukcji dwutlenku węgla z powietrza (hipoteza postawiona przez K. Bassalika w 1909 r.). Gdy znajdują się one w pożywce zawierającej kwas szczawiowy, energię potrzebną do re-

Tabela 1

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce ze szczawianem

The respiration of *Ps. extorquens* on oxalate

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ³⁰	— 9,0	+ 2,5	0,28
1 ⁰⁰	— 20,7	+ 8,9	0,43
1 ³⁰	— 24,4	+ 11,2	0,46
2 ⁰⁰	— 34,3	+ 16,4	0,48
2 ³⁰	— 47,8	+ 24,7	0,52
3 ⁰⁰	— 56,8	+ 28,9	0,51
3 ³⁰	— 67,6	+ 35,2	0,52
4 ⁰⁰	— 80,2	+ 42,5	0,53
4 ³⁰	— 92,8	+ 49,9	0,54
5 ⁰⁰	— 102,1	+ 55,9	0,55
5 ³⁰	— 110,9	+ 61,6	0,56
6 ⁰⁰	— 120,8	+ 68,4	0,57
6 ³⁰	— 132,5	+ 79,8	0,60
7 ⁰⁰	— 146,0	+ 88,1	0,60
7 ³⁰	— 159,5	+ 97,3	0,61
8 ⁰⁰	— 183,9	+ 104,4	0,57

Tabela 2

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w wodzie destylowanej

Bakterie wyhodowane w pożywce ze szczawianem

The endogenous respiration of *Ps. extorquens*, grown on oxalate

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ³⁰	— 4,6	— 6,4	
1 ⁰⁰	— 9,8	— 7,4	
1 ³⁰	— 16,1	— 5,6	
2 ⁰⁰	— 21,8	— 3,6	
2 ³⁰	— 27,7	— 1,0	
3 ⁰⁰	— 33,3	+ 1,5	0,045
3 ³⁰	— 41,0	+ 6,3	0,153
4 ⁰⁰	— 46,6	+ 8,7	0,187
4 ³⁰	— 54,1	+ 13,9	0,26
5 ⁰⁰	— 61,2	+ 18,2	0,30
5 ³⁰	— 67,1	+ 21,4	0,32
6 ⁰⁰	— 75,1	+ 26,0	0,35
6 ³⁰	— 86,9	+ 29,3	0,36
7 ⁰⁰	— 87,8	+ 33,9	0,39
7 ³⁰	— 94,9	+ 38,1	0,40
8 ⁰⁰	— 100,2	+ 41,2	0,41

T a b e l a 3

Różnice w ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce ze szczawianem i w wodzie destylowanej

The differences between uptake of oxygen and output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on oxalate and on distilled water

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l O}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\mu\text{l CO}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l CO}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—	—	—	—	—
0 ³⁰	— 9,0	— 4,6	4,4	+ 2,5	— 6,4	+ 8,9	2,02
1 ⁰⁰	— 20,7	— 9,8	10,9	+ 8,9	— 7,4	+ 16,3	1,50
1 ³⁰	— 24,4	— 16,1	8,3	+ 11,2	— 5,6	+ 16,8	2,03
2 ⁰⁰	34,3	21,8	12,5	+ 16,4	— 3,6	+ 20,0	1,60
2 ³⁰	— 47,8	— 27,7	20,1	+ 24,7	— 1,0	+ 25,7	1,28
3 ⁰⁰	— 56,8	— 33,3	23,5	+ 28,9	+ 1,5	+ 27,4	1,17
3 ³⁰	— 67,6	— 41,0	26,6	+ 35,2	+ 6,3	+ 28,9	1,09
4 ⁰⁰	— 80,2	— 46,6	33,6	+ 42,5	+ 8,7	+ 33,8	1,01
4 ³⁰	— 92,8	— 54,1	38,7	+ 49,9	+ 13,9	+ 36,0	0,93
5 ⁰⁰	— 102,7	— 61,2	41,5	+ 55,9	+ 18,2	+ 37,7	0,91
5 ³⁰	— 110,9	— 67,1	43,8	+ 61,6	+ 21,4	+ 40,2	0,92
6 ⁰⁰	— 120,8	— 75,1	45,7	+ 68,4	+ 26,0	+ 42,4	0,93
6 ³⁰	— 132,5	— 80,9	51,6	+ 79,8	+ 29,3	+ 50,5	0,98
7 ⁰⁰	— 146,0	— 87,8	58,2	+ 88,1	+ 33,9	+ 54,2	0,93
7 ³⁰	— 159,5	— 94,9	64,6	+ 97,3	+ 38,1	+ 59,2	0,90
8 ⁰⁰	— 183,9	— 100,2	83,7	+ 104,4	+ 41,2	+ 63,2	0,76

dukcji dwutlenku węgla uzyskują z utleniania kwasu. W wyniku tej redukcji wartość współczynnika oddechowego powinna być obniżona. Jednakże samo obniżanie wartości współczynnika nie może świadczyć o zdolności do redukcji dwutlenku węgla. Gdy bakterie *Ps. extorquens* znajdują się w wodzie destylowanej, energię potrzebną na redukcję dwutlenku węgla uzyskują przez spalanie materiałów komórkowych i zautolizowanych komórek. Wprawdzie i wtedy pewna ilość dwutlenku węgla powinna być wydzielona, ale ilość zredukowanego dwutlenku przewyższa początkowo ilość wydzielonego, tak że w efekcie następuje pobranie.

W celu potwierdzenia hipotezy zakładającej zdolność do redukcji dwutlenku węgla przez *Pseudomonas*, bakterie zaszczipiono do pożywek C, D i E nie zawierających organicznych związków węgla. We wszystkich trzech pożywkach wzrost rozpoczął się po 48 godzinach. Naprzód nastąpiło zmętnienie całej pożywki, następnie zaczęła się wytwarzać, jak normalnie na pożywce szczawianowej, delikatna błonka na dnie i ściankach naczynia. Przy poruszeniu błonka odrywała się i unosiła w płynie. Po tygodniu błonki w pożywce C i D zaczęły się zabarwiać na kolor różowy, w pożywce E pozostały bezbarwne.

W doświadczeniu powyższym stwierdzono dość dobry wzrost bakterii w pożywkach, które jako źródło węgla zawierały tylko nieorganiczne węglany, bądź w pożywce bezwęglowej, gdzie źródłem węgla mógł być tylko dwutlenek węgla z powietrza. Źródłem energii dla redukcji dwutlenku węgla nie było ani utlenianie tiosiarczanu (oznaczonego jodometrycznie), ani utlenianie amonu (wykazano brak azotynów i azotanów). Jedynie wykryto jakościowo ubytek amonu. Można przypuścić, że wobec tego źródłem energii dla rozmnażających się komórek było utlenianie zautolizowanego materiału, wprowadzonego przy szczepieniu wraz z komórkami żywymi.

Oznaczanie współczynnika oddechowego Ps. extorquens w pożywce z glukozą

Pomiar wymiany gazowej bakterii znajdujących się w pożywce z glukozą trwał 4 godziny, odczyty manometryczne dokonywano co 15 minut. Stwierdzono, że w ciągu całego doświadczenia ilość pobranych mikrolitrów tlenu w przeliczeniu na 10 mg suchej masy bakterii wyniosła 289,9 a ilość wydzielonych mikrolitrów dwutlenku węgla — 212,8. Wartości współczynnika oddechowego wzrosły z 0,58 do 0,73. Ilości pobrane w równych odstępach czasu, w pierwszej godzinie mniej więcej równe, zaczynają najprzód powoli, a w ostatniej godzinie szybko spadać (tabela 4). Stwierdzamy w tym doświadczeniu, że współczynnik oddechowy 0,58 — 0,73 jest niższy od współczynnika wyliczonego teoretycznie, równego 1. Wynik ten można by wytłumaczyć zużyciem części produktów

Tabela 4

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą

The respiration of *Ps. extorquens* on glucose

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ¹⁵	— 15,6	+ 9,0	0,58
0 ³⁰	— 44,9	+ 29,5	0,66
0 ⁴⁵	— 68,9	+ 42,3	0,61
1 ⁰⁰	— 94,9	+ 58,7	0,62
1 ¹⁵	— 121,0	+ 75,3	0,62
1 ³⁰	— 140,4	+ 87,0	0,62
1 ⁴⁵	— 160,4	+ 102,0	0,64
2 ⁰⁰	— 179,0	+ 126,6	0,65
2 ¹⁵	— 197,1	+ 131,4	0,67
2 ³⁰	— 214,4	+ 145,9	0,68
2 ⁴⁵	— 232,0	+ 161,0	0,69
3 ⁰⁰	— 248,2	+ 175,7	0,71
3 ¹⁵	— 262,7	+ 189,2	0,72
3 ³⁰	— 271,2	+ 196,8	0,73
3 ⁴⁵	— 280,7	+ 204,6	0,73
4 ⁰⁰	— 289,9	+ 212,8	0,73

Tabela 5

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w wodzie destylowanej

Bakterie wyhodowane w pożywce z glukozą
The endogenous respiration of *Ps. extorquens*, grown on glucose

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ¹⁵	— 6,1	+ 5,6	0,92
0 ³⁰	— 12,0	+ 10,5	0,87
0 ⁴⁵	— 18,6	+ 15,5	0,83
1 ⁰⁰	— 24,1	+ 19,8	0,82
1 ¹⁵	— 30,0	+ 27,3	0,91
1 ³⁰	— 34,8	+ 27,5	0,79
1 ⁴⁵	— 41,1	+ 32,3	0,79
2 ⁰⁰	— 45,7	+ 36,2	0,79
2 ¹⁵	— 51,4	+ 40,5	0,79
2 ³⁰	— 56,4	+ 44,0	0,78
2 ⁴⁵	— 61,2	+ 47,4	0,77
3 ⁰⁰	— 66,1	+ 51,2	0,77
3 ¹⁵	— 70,2	+ 54,5	0,78
3 ³⁰	— 74,0	+ 57,5	0,78
3 ⁴⁵	— 78,6	+ 61,1	0,78
4 ⁰⁰	— 82,8	+ 64,4	0,78

rozkładu glukozy w syntezie nowych związków komórkowych. W tabeli 5 przedstawiono wyniki pomiarów wymiany gazowej bakterii znajdujących się w wodzie destylowanej. Oddychanie bakterii w wodzie destylowanej było już opisane uprzednio; różnica między doświadczeniami polegała na tym, że w pierwszym wypadku *Ps. extorquens* była hodowana w pożywce ze szczawianem, w drugim wypadku w pożywce z glukozą. Różnica ta spowodowała bardzo znaczne odchylenia w ilościach pobieranych i wydzielanych gazów oraz w ich wzajemnym stosunku. W okresie 4-godzinnym, gdy bakterie hodowane w pożywce z glukozą pobrały 82,8 μ l tlenu, wydzieliły 64,4 μ l dwutlenku węgla, bakterie hodowane w pożywce ze szczawianem pobrały 46,6 μ l tlenu, wydzieliły 8,7 μ l dwutlenku węgla. Gdy współczynnik oddechowy bakterii wyhodowanych w pożywce ze szczawianem był bardzo niski (początkowo ujemny, dwutlenek węgla był pobierany) i po czterech godzinach wynosił 0,19, współczynnik oddechowy bakterii wyhodowanych w pożywce z glukozą wahał się w granicach 0,92 — 0,78. Powyższe wyniki można by wytłumaczyć różnicami w ilości ewentualnie jakości materiałów zapasowych samych bakterii hodowanych na różnych pożywkach oraz różnym ich metabolizmem.

Zgodnie z założeniem postawionym na początku opisu części eksperymentalnej, aby otrzymać ilości gazów związane z utlenianiem tylko samej glukozy, od ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla w pożywce odjęto ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się w wodzie. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 6. W okresie czterogodzinnym, gdy bakterie na utlenianie kwasu szczawiowego zużyły 33,6 μ l tlenu (tabela 3), na utlenianie glukozy zużyły 207,1 μ l tlenu (tabela 6). Gdy w wypadku pierwszym wartości współczynnika oddechowego spadły z 2,02 do 1,01, w drugim wzrastały od 0,36 do 0,72. Kwas szczawiowy jest dużo silniej utlenionym związkiem niż glukoza. Aby całkowicie utlenić tę samą ilość wagową glukozy, co kwasu szczawiowego, potrzeba około sześć razy więcej tlenu, co odpowiadałoby mniej więcej stosunkowi 207,1 : 33,6. Należy przy tym zaznaczyć, że ilość glukozy w pożywce branej do pomiarów wynosiła ok. 2%, ilość kwasu szczawiowego ok. 0,1% (optymalna dla *Ps. extorquens*). Otrzymane wyniki wskazują na to, że szybkość utleniania glukozy była mniej więcej równa szybkości utleniania kwasu szczawiowego, mimo że ilość glukozy była dwudziestokrotnie większa.

Należy tu zaznaczyć, że bardziej właściwe porównanie wymiany gazowej bakterii w pożywce ze szczawianem i z glukozą uzyskano by, gdyby pożywki te zawierały jednakowe ilości węgla i azotu. W pracy tej stosowano jednak pożywkę z 2% glukozy, peptonem i bulionem ze względu na wyjątkowo dobry wzrost hodowanych w niej bakterii, które od 1948 r. są przechowywane na agarze z glukozą.

T a b e l a 6

Różnice w ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą i wodzie destylowanej

The differences between uptake of oxygen and output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on glucose and on distilled water

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l O}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\mu\text{l CO}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l CO}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—	—	—	—	—
0 ¹⁵	— 15,6	— 6,1	— 9,5	+ 9,0	+ 5,6	+ 3,4	0,36
0 ³⁰	— 44,9	— 12,0	— 32,9	+ 29,5	+ 10,5	+ 19,0	0,58
0 ⁴⁵	— 68,9	— 18,6	— 50,3	+ 42,3	+ 15,5	+ 26,8	0,53
1 ⁰⁰	— 94,9	— 24,1	— 70,8	+ 58,7	+ 19,8	+ 38,9	0,55
1 ¹⁵	— 121,0	— 30,0	— 91,0	+ 75,3	+ 27,3	+ 48,0	0,53
1 ³⁰	— 140,4	— 34,8	— 105,6	+ 87,0	+ 27,5	+ 59,5	0,56
1 ⁴⁵	— 160,4	— 41,1	— 119,3	+ 102,0	+ 32,3	+ 69,7	0,58
2 ⁰⁰	— 179,0	— 45,7	— 133,3	+ 116,6	+ 36,2	+ 80,4	0,60
2 ¹⁵	— 197,1	— 51,4	— 145,7	+ 131,4	+ 40,5	+ 90,9	0,62
2 ³⁰	— 214,4	— 56,4	— 158,0	+ 145,9	+ 44,0	+ 101,9	0,64
2 ⁴⁵	— 232,0	— 61,2	— 170,8	+ 161,0	+ 47,4	+ 113,6	0,66
3 ⁰⁰	— 248,2	— 66,1	— 182,1	+ 175,7	+ 51,2	+ 124,5	0,68
3 ¹⁵	— 262,7	— 70,2	— 192,5	+ 189,2	+ 54,5	+ 134,7	0,70
3 ³⁰	— 271,2	— 74,0	— 197,2	+ 196,8	+ 57,5	+ 139,3	0,71
3 ⁴⁵	— 280,7	— 78,0	— 202,1	+ 204,6	+ 61,1	+ 143,5	0,71
4 ⁰⁰	— 289,9	— 82,8	— 207,1	+ 212,8	+ 64,4	+ 148,4	0,72

*Wpływ azydku sodu na metabolizm Ps. extorquens
w pożywce ze szczawianem amonu*

Doświadczenie mające na celu zbadanie wpływu azydku sodu na metabolizm *Ps. extorquens* było przeprowadzone analogicznie do doświadczenia, w którym oznaczono współczynnik oddechowy bakterii w pożywce ze szczawianem amonu, z tą różnicą, że do pożywki dodano azydku sodu w ilości M/400. Pomiar wymiany gazowej bakterii trwał 8 godzin, odczyty manometryczne dokonywano co 30 minut. Stwierdzono, że ilość pobranych μl tlenu w przeliczeniu na 10 mg suchej masy bakterii w ciągu całego doświadczenia wyniosła 93,1, ilość zaś wydzielonych μl dwutlenku węgla — 79,9. Wartości współczynnika oddechowego wzrastały od 0,78 do 0,86 (tabela 7). Dodanie azydku sodu w ilości M/400 do pożywki ze szczawianem spowodowało zmniejszenie ilości pobranego przez bakterie tlenu do 50,6%, ilości zaś wydzielonego dwutlenku węgla do 76,5%, w wyniku czego końcowa wartość współczynnika oddechowego wzrosła z 0,57 do 0,86. Przeprowadzono również pomiar wymiany gazowej bakterii znajdujących się w wodzie destylowanej z dodatkiem M/400 azydku sodu. I w tym wypadku stwierdzono hamujący wpływ azydku na pobieranie tlenu przez bakterie. Ilość pobranego tlenu równa 71,5 μl w przeliczeniu na 10 mg suchej masy stanowi 71,3% ilości tlenu pobranego przez bakterie w wodzie destylowanej bez azydku. Natomiast ilość wydzielonego dwutlenku węgla wzrosła do 50,8 μl , co stanowi 123,5% ilości dwutlenku węgla wydzielonego przez bakterie w wodzie destylowanej bez azydku. Na skutek powyższych zmian w ilościach pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla współczynnik oddechowy wzrósł z wartości 0,41 do wartości 0,71. Wyniki powyższego doświadczenia przedstawiono w tabeli 8.

W tabeli 9 przedstawiono różnice w ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się w pożywce ze szczawianem i w wodzie destylowanej w obecności azydku sodu. Ilość tlenu zużytego na utlenienie kwasu szczawiowego spadła pod wpływem azydku do 21,6 μl (25,8%), ilość wydzielonego dwutlenku węgla do 29,1 μl (46%). Wartości współczynnika oddechowego, odpowiadające początkowo mniej więcej wartościom przy utlenianiu kwasu szczawiowego przez bakterie niezatrute, po dwu i pół godzinach od początku doświadczenia były stale wyższe. Po ośmiu godzinach współczynnik oddechowy bakterii zatrutych wynosił 1,35, niezatrutych 0,76. Na podstawie danych umieszczonych w tablicach: 1, 2, 3, 7, 8, 9 sporządzono trzy wykresy obrazujące wymianę gazową *Pseudomonas* niezatrutych i zatrutych azydkiem.

Na wykresie I przedstawiono pobieranie tlenu przez bakterie w pożywce ze szczawianem i w wodzie destylowanej. Dodanie azydku sodu

Tabela 7

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce ze szczawianem z dodatkiem M/400 azydku sodu

The respiration of *Ps. extorquens* on oxalate in presence of M/400 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	CO_2 O_2
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ³⁰	— 6,9	+ 5,6	0,81
1 ⁰⁰	— 12,6	+ 9,9	0,79
1 ³⁰	— 18,6	+ 14,6	0,78
2 ⁰⁰	— 25,1	+ 20,7	0,82
2 ³⁰	— 30,8	+ 24,9	0,81
3 ⁰⁰	— 37,0	+ 30,8	0,83
3 ³⁰	— 42,1	+ 34,5	0,82
4 ⁰⁰	— 47,8	+ 39,7	0,83
4 ³⁰	— 53,4	+ 44,9	0,84
5 ⁰⁰	— 59,0	+ 49,2	0,83
5 ³⁰	— 64,1	+ 52,8	0,82
6 ⁰⁰	— 69,8	+ 58,1	0,83
6 ³⁰	— 76,1	+ 65,0	0,85
7 ⁰⁰	— 83,6	+ 71,4	0,85
7 ³⁰	— 87,4	+ 74,5	0,85
8 ⁰⁰	— 93,1	+ 79,9	0,86

Tabela 8

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w wodzie destylowanej z dodatkiem M/400 azydku sodu

Bakterie wyhodowane w pożywce ze szczawianem
The endogenous respiration of *Ps. extorquens*, grown on oxalate, in presence of M/400 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	CO_2 O_2
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ³⁰	— 3,5	— 0,8	—
1 ⁰⁰	— 8,3	+ 1,3	0,16
1 ³⁰	— 12,3	+ 4,2	0,34
2 ⁰⁰	— 15,9	+ 7,0	0,44
2 ³⁰	— 19,8	+ 9,1	0,46
3 ⁰⁰	— 24,5	+ 12,9	0,52
3 ³⁰	— 28,0	+ 15,5	0,55
4 ⁰⁰	— 30,9	+ 18,1	0,59
4 ³⁰	— 35,6	+ 21,7	0,61
5 ⁰⁰	— 39,8	+ 25,2	0,63
5 ³⁰	— 45,3	+ 29,7	0,66
6 ⁰⁰	— 50,5	+ 34,0	0,67
6 ³⁰	— 55,4	+ 37,7	0,68
7 ⁰⁰	— 60,5	+ 41,7	0,69
7 ³⁰	— 65,9	+ 46,5	0,70
8 ⁰⁰	— 71,5	+ 50,8	0,71

T a b e l a 9

Różnice w ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce ze szczawianem i w wodzie destylowanej w obecności M/400 azydku sodu

The differences between uptake of oxygen and output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on oxalate and on distilled water, in presence of M/400 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l O}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\mu\text{l CO}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l CO}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—	—	—	—	—
0 ³⁰	— 6,9	— 3,5	— 3,4	+ 5,6	— 0,8	+ 6,4	1,88
1 ⁰⁰	— 12,6	— 8,3	— 4,3	+ 9,9	+ 1,3	+ 8,6	2,00
1 ³⁰	— 18,6	— 12,3	— 6,3	+ 14,6	+ 4,2	+ 10,4	1,65
2 ⁰⁰	— 25,1	— 15,9	— 9,2	+ 20,7	+ 7,0	+ 13,7	1,49
2 ³⁰	— 30,8	— 19,8	— 11,0	+ 24,9	+ 9,1	+ 15,8	1,44
3 ⁰⁰	— 37,0	— 24,5	— 12,5	+ 30,8	+ 12,9	+ 17,9	1,43
3 ³⁰	— 42,1	— 28,0	— 14,1	+ 34,5	+ 15,5	+ 19,0	1,35
4 ⁰⁰	— 47,8	— 30,9	— 16,9	+ 39,7	+ 18,1	+ 21,6	1,28
4 ³⁰	— 53,4	— 35,6	— 17,8	+ 44,9	+ 21,7	+ 23,2	1,30
5 ⁰⁰	— 59,0	— 39,8	— 19,2	+ 49,2	+ 25,2	+ 24,0	1,25
5 ³⁰	— 64,1	— 45,3	— 18,8	+ 52,8	+ 29,7	+ 23,1	1,23
6 ⁰⁰	— 69,8	— 50,5	— 19,3	+ 58,1	+ 34,0	+ 24,1	1,25
6 ³⁰	— 76,1	— 55,4	— 20,7	+ 65,0	+ 37,7	+ 27,3	1,32
7 ⁰⁰	— 83,6	— 60,5	— 23,1	+ 71,4	+ 41,7	+ 29,7	1,29
7 ³⁰	— 87,4	— 65,9	— 21,5	+ 74,5	+ 46,5	+ 28,0	1,31
8 ⁰⁰	— 93,1	— 71,5	— 21,6	+ 79,9	+ 50,8	+ 29,1	1,35

spowodowało silniejsze zahamowanie pobierania tlenu w pożywce ze szczawianem niż w wodzie. Jak wynika z wykresu II, azydek sodu działał cały czas stymulująco na wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie

Wykres I. Pobieranie tlenu przez *Ps. extorquens* w pożywce ze szczawianem i w wodzie destylowanej.

The uptake of oxygen by *Ps. extorquens* on oxalate and in distilled water

1 — pobieranie tlenu w pożywce ze szczawianem
the uptake of oxygen on oxalate

2 — pobieranie tlenu w pożywce ze szczawianem z dodatkiem M/400 azydku sodu
the uptake of oxygen on oxalate in presence of M/400 sodium azide

1a — pobieranie tlenu w wodzie destylowanej
the uptake of oxygen in distilled water

2a — pobieranie tlenu w wodzie destylowanej z dodatkiem M/400 azydku sodu
the uptake of oxygen in distilled water in presence of M/400 sodium azide

Wykres II. Wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce ze szczawianem i wodzie destylowanej

The output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on oxalate and in distilled water

1 — wydzielanie dwutlenku węgla w pożywce ze szczawianem
the output of carbon dioxide on oxalate

2 — wydzielanie dwutlenku węgla w pożywce ze szczawianem z dodatkiem M/400 azydku sodu
the output of carbon dioxide on oxalate in presence of M/400 sodium azide

1a — wydzielanie dwutlenku węgla w wodzie destylowanej
the output of carbon dioxide in distilled water

2a — wydzielanie dwutlenku węgla w wodzie destylowanej z dodatkiem M/400 azydku sodu
the output of carbon dioxide in distilled water in presence of M/400 sodium azide

znajdujące się w wodzie, natomiast wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie w pożywce szczawianowej z początku słabo stymulował, zaś po trzech i pół godzinach zaczął hamować.

Na wykresie III przedstawiono pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla związane z samym utlenianiem kwasu szczawiowego. Azydek sodu zahamował zarówno pobieranie tlenu, jak i wydzielanie dwutlenku węgla, lecz wskutek tego, że intensywność hamowania była różna, w wypadku bakterii niezatrutych ilości wydzielonego dwutlenku węgla po 4 godzinach zaczynają być mniejsze niż ilości pobranego tlenu,

w wypadku bakterii zatrutych ilości wydzielonego dwutlenku węgla są stale większe niż ilości pobranego tlenu.

Ilości wydzielonego przez bakterie dwutlenku węgla związane są nie tylko z procesami utleniania, ale i z procesami syntezy. Wzmoczenie procesu syntezy powinno spowodować zmniejszenie się ilości wydzielonego dwutlenku węgla, i na odwrót — zahamowanie, zwiększenie się ilości wydzielonego dwutlenku węgla. Jeżeli jakiś związek działałby na metabolizm organizmu w ten sposób, że nie wpływając na oddychanie zahamowałby całkowicie procesy syntezy, ilości wymienianych gazów powinnyby odpowiadać teoretycznie wyliczonym ilościom potrzebnym dla utleniania danego substratu. W wyżej przytoczonych doświadczeniach azydek sodu działał hamująco na procesy utleniania, jak i na procesy syntezy. Jednak wyraźne zwiększenie się współczynnika oddechowego świadczy o tym, że hamował on silniej procesy syntezy.

Wpływ azydku sodu na Ps. extorquens w pożywce z glukozą

Doświadczenia nad zbadaniem wpływu azydku sodu na metabolizm *Pseudomonas extorquens* zostały przeprowadzone analogicznie do wyżej opisanego doświadczenia, w którym oznaczono współczynnik oddechowy bakterii w pożywce z glukozą. Pomiary trwały cztery godziny, odczyty manometryczne dokonywano co 15 minut. Ilość dodanego azydku sodu wynosiła w doświadczeniu pierwszym M/600, w doświadczeniu drugim M/400, w doświadczeniu trzecim M/200.

Ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w ciągu 4 godzin.

	Ilość pobranego O ₂ w µl	Ilość pobranego O ₂ w %	Ilość wydzielonego CO ₂ w µl	Ilość wydzielonego CO ₂ w %	$\frac{CO_2}{O_2}$
--	-------------------------------------	------------------------------------	---	--	--------------------

Bakterie w pożywce z glukozą

Bez azydku	289,9	100	212,8	100	0,73
NaN ₃ = M/600	346,8	119,6	279,9	131,9	0,81
NaN ₃ = M/400	346,4	119,5	295,7	139	0,85
NaN ₃ = M/200	244,3	84,3	216,7	101,8	0,89

Bakterie w wodzie destylowanej

Bez azydku	82,8	100	64,4	100	0,78
NaN ₃ = M/600	64,8	78,3	59,5	92,4	0,92
NaN ₃ = M/400	90,8	109,7	81,6	126,7	0,90
NaN ₃ = M/200	76,0	91,8	70,8	109,9	0,93

Ilości gazów związane z samym utlenianiem glukozy

Bez azydku	207,1	100	148,4	100	0,72
NaN ₃ = M/600	282,0	136,1	220,4	148,5	0,78
NaN ₃ = M/400	255,6	123,4	214,1	144,3	0,84
NaN ₃ = M/200	168,3	81,3	145,9	98,0	0,87

W doświadczeniu pierwszym stwierdzono, że 10 mg suchej masy bakterii pobrało w ciągu 4 godzin 346,8 μl tlenu, tj. 119,6‰ w stosunku do ilości tlenu pobranego przez bakterie niezatrute, oraz wydzieliło 279,9 μl

Wykres III. Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* związane z samym utlenianiem szczawianu

The differences between uptake of oxygen and output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on oxalate and in distilled water

- 1 — pobieranie tlenu — the uptake of oxygen
- 2 — wydzielanie dwutlenku węgla
the output of carbon dioxide
- 3 — pobieranie tlenu przez bakterie zatrute azydem w stężeniu M/400
the uptake of oxygen in presence of M/400 sodium azide
- 4 — wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie zatrute azydem sodu w stężeniu M/400
the output of oxygen in presence of M/400 sodium azide

tlenu węgla do 220,4 μl , tj. do 148,5‰. Końcowa wartość współczynnika oddechowego wzrosła z 0,72 do 0,78 (tabela 12).

W następnym doświadczeniu zastosowano większe stężenie azydku sodu M/400, które w efekcie końcowym podziało równie stymulująco na pobieranie tlenu przez bakterie znajdujące się w pożywce z glukozą, co stężenie M/600 (ogólna ilość tlenu pobranego w okresie 4 godzin wynosiła 346,4 μl). Ilość wydzielonego dwutlenku węgla wzrosła do 295,7 μl , tj. do 139‰. Końcowa wartość współczynnika oddechowego wzrosła do 0,85 (tabela 13).

Większe stężenie azydku w wodzie destylowanej nie spowodowało zahamowania pobierania tlenu, a przeciwnie, podziało raczej stymulująco. Ilość μl tlenu pobrana przez 10 mg suchej masy bakterii w okresie 4 godzin wyniosła 90,8 μl , tj. 109,7‰ w stosunku do bakterii niezatrutych. Również ilość wydzielonego dwutlenku węgla wzrosła do 81,6 μl , tj. do

dwutlenku węgla, tj. 131,5‰ w stosunku do ilości dwutlenku węgla wydzielonego przez bakterie niezatrute. Końcowa wartość współczynnika oddechowego wzrosła od 0,73 do 0,81 (tabela 10).

10 mg suchej masy bakterii w wodzie destylowanej z dodatkiem M/600 azydki sodu pobrało w ciągu 4 godzin 64,8 μl tlenu, tj. 78,3‰ w stosunku do ilości tlenu pobranego przez bakterie niezatrute, oraz wydzieliło 59,5 μl dwutlenku węgla, tj. 92,4‰ w stosunku do ilości dwutlenku węgla wydzielonego przez bakterie niezatrute. Końcowa wartość współczynnika oddechowego wzrosła z 0,78 do 0,92 (tabela 11).

Ilość tlenu pobrana na samo utlenianie glukozy (wynikła z różnicy między ilością tlenu pobranego przez bakterie w pożywce z glukozą i w wodzie destylowanej) pod wpływem azydki sodu wzrosła do 282 μl , tj. do 136,1‰, a ilość wydzielonego dwu-

126,7%. Wartości współczynnika oddechowego były mniej więcej takie same, jak wartości współczynnika w wodzie z mniejszym stężeniem azydku, tym samym większe niż współczynnik oddechowy bakterii w wodzie destylowanej, więc niezatrutych (tabela 14).

Ilość tlenu pobrana na samo utlenianie glukozy zmniejszyła się pod wpływem większego stężenia azydku do 255,6 μ l, była jednak w dalszym ciągu większa niż ilość pobrana przez bakterie niezatrute, stanowiła bowiem 123,4%. Ilość wydzielonego dwutlenku węgla spadła do 214,1 μ l, pozostając jednak również większą niż ilość wydzielona przez bakterie niezatrute — 144,3%. Końcowa wartość współczynnika oddechowego wzrosła w tym wypadku do 0,84 (tabela 15).

Największe stosowane stężenie azydku wynosiło M/200. Taka ilość azydku zahamowała pobieranie tlenu przez bakterie na pożywce z glukozą do 84,3% (ilość pobieranego tlenu w okresie 4 godzin wynosiła 244,3 μ l) oraz prawie nie zmieniła ogólnej ilości wydzielanego dwutlenku węgla. Współczynnik oddechowy wzrósł do 0,89 (tabela 16). W wodzie destylowanej stężenie azydku M/200 lekko zahamowało pobieranie tlenu (ilość pobranego tlenu przez 10 mg suchej masy bakterii w wodzie z azydkiem wyniosła 76 μ l, tj. 91,8% w stosunku do ilości pobranej przez bakterie niezatrute). Ilość wydzielonego dwutlenku węgla, mimo że mniejsza niż przy stężeniu azydku M/400, była jednak większa od ilości wydzielonej przez bakterie znajdujące się w wodzie bez azydku. W okresie 4 godzin bakterie wydzieliły 70,8 μ l dwutlenku węgla, tj. 109,9%. Końcowa wartość współczynnika oddechowego wzrosła do 0,93 (tabela 17).

Ilość μ l tlenu wyliczona z różnicy między ilością pobranego tlenu przez bakterie w pożywce z glukozą i ilością pobranego tlenu przez bakterie w wodzie destylowanej przy zatruciu M/200 azydkiem sodu zmniejszyła się do 168,3 μ l, czyli do 81,3% w stosunku do tej samej różnicy z bakteriami niezatrutymi. Ogólne ilości wydzielonego dwutlenku węgla przez bakterie zatrute i niezatrute, obliczone na tej samej zasadzie co pobranie tlenu, były mniej więcej równe (145,9 i 148,4 μ l). Maksymalna wartość współczynnika oddechowego wynosiła 0,87 (tabela 18).

Z wyżej przytoczonych wyników doświadczeń można wyprowadzić wniosek, że to samo stężenie azydku sodu działa inaczej na pobieranie przez bakterie tlenu, inaczej na wydzielanie dwutlenku węgla. Poza tym działanie to uzależnione jest od substratu utlenianego przez bakterie i nawet od pożywki, w której wyrosły bakterie użyte do doświadczenia. Np. azydek sodu w stężeniu 1/400 molarnym zahamował częściowo pobieranie tlenu i zwiększył wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się w wodzie destylowanej, wyhodowane w pożywce ze szczawianem. To samo stężenie azydku działało stymulująco tak na pobieranie tlenu, jak na wydzielanie dwutlenku węgla (na wydzielanie dwutlenku

T a b e l a 10

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą z dodatkiem M/600 azydku sodu

The respiration of *Ps. extorquens* on glucose in presence of M/600 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ¹⁵	— 29,1	+ 28,4	0,98
0 ³⁰	— 50,4	+ 45,2	0,90
0 ⁴⁵	— 76,7	+ 66,3	0,86
1 ⁰⁰	— 104,8	+ 88,0	0,84
1 ¹⁵	— 139,2	+ 116,2	0,83
1 ³⁰	— 168,9	+ 138,6	0,82
1 ⁴⁵	— 198,7	+ 162,4	0,82
2 ⁰⁰	— 225,6	+ 182,6	0,81
2 ¹⁵	— 251,3	+ 202,1	0,80
2 ³⁰	— 269,4	+ 213,7	0,79
2 ⁴⁵	— 284,2	+ 223,3	0,79
3 ⁰⁰	— 298,2	+ 235,7	0,79
3 ¹⁵	— 311,4	+ 247,1	0,79
3 ³⁰	— 329,9	+ 258,3	0,78
3 ⁴⁵	— 334,9	+ 264,1	0,79
4 ⁰⁰	— 346,8	+ 279,9	0,81

T a b e l a 11

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w wodzie destylowanej z dodatkiem M/600 azydku sodu

Bakterie wyhodowane w pożywce z glukozą
The endogenous respiration of *Ps. extorquens*, grown on glucose, in presence of M/600 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ¹⁵	— 5,9	+ 5,9	1,00
0 ³⁰	— 11,5	+ 10,4	0,90
0 ⁴⁵	— 16,7	+ 15,0	0,90
1 ⁰⁰	— 21,2	+ 18,8	0,89
1 ¹⁵	— 26,8	+ 24,3	0,91
1 ³⁰	— 30,9	+ 27,9	0,90
1 ⁴⁵	— 35,0	+ 31,6	0,90
2 ⁰⁰	— 39,1	+ 35,4	0,91
2 ¹⁵	— 43,2	+ 39,5	0,91
2 ³⁰	— 47,3	+ 43,1	0,91
2 ⁴⁵	— 51,0	+ 46,5	0,91
3 ⁰⁰	— 54,0	+ 49,4	0,91
3 ¹⁵	— 56,6	+ 51,8	0,92
3 ³⁰	— 60,7	+ 55,6	0,92
3 ⁴⁵	— 62,2	+ 56,8	0,91
4 ⁰⁰	— 64,8	+ 59,5	0,92

T a b e l a 12

Różnice w ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą i w wodzie destylowanej w obecności M/600 azydku sodu
 The differences between uptake of oxygen and output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on glucose and on distilled water in presence of M/600 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l O}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\mu\text{l CO}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l CO}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—	—	—	—	—
0 ¹⁵	— 29,1	— 5,9	— 23,2	+ 28,4	+ 5,9	+ 22,5	0,97
0 ³⁰	— 50,4	11,5	— 38,9	+ 45,2	+ 10,4	+ 34,8	0,89
0 ⁴⁵	— 76,7	— 16,7	— 60,0	+ 66,3	+ 15,0	+ 51,3	0,85
1 ⁰⁰	— 104,8	— 21,2	— 83,6	+ 88,0	+ 18,8	+ 69,2	0,83
1 ¹⁵	— 139,2	— 26,8	— 112,4	+ 116,2	+ 24,3	+ 91,9	0,82
1 ³⁰	— 168,9	— 30,9	— 138,0	+ 138,6	+ 27,9	+ 110,7	0,80
1 ⁴⁵	— 198,7	— 35,0	— 163,7	+ 162,4	+ 31,6	+ 130,8	0,80
2 ⁰⁰	— 225,6	— 39,1	— 186,5	+ 182,6	+ 35,4	+ 147,2	0,79
2 ¹⁵	— 251,3	— 43,2	— 208,1	+ 202,1	+ 39,5	+ 162,6	0,78
2 ³⁰	— 269,4	— 47,3	— 222,1	+ 213,7	+ 42,1	+ 170,6	0,77
2 ⁴⁵	— 284,2	— 51,0	— 233,2	+ 223,3	+ 46,5	+ 176,8	0,76
3 ⁰⁰	— 298,2	— 54,0	— 244,2	+ 235,7	+ 49,4	+ 186,3	0,76
3 ¹⁵	— 311,4	— 56,6	— 254,8	+ 247,1	+ 51,8	+ 195,3	0,77
3 ³⁰	— 229,9	— 60,7	— 269,2	+ 258,3	+ 55,6	+ 202,7	0,75
3 ⁴⁵	— 334,9	— 62,2	— 272,7	+ 264,1	+ 56,8	+ 207,3	0,76
4 ⁰⁰	— 346,8	— 64,8	— 282,0	+ 279,9	+ 59,5	+ 220,4	0,78

T a b e l a 13

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą z dodatkiem M/400 azydki sodu

The respiration of *Ps. extorquens* on glucose in presence of M/400 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ¹⁵	— 19,5	+ 15,0	0,77
0 ³⁰	— 37,8	+ 29,1	0,77
0 ⁴⁵	— 54,5	+ 41,1	0,75
1 ⁰⁰	— 72,8	+ 55,2	0,76
1 ¹⁵	— 92,3	+ 70,3	0,76
1 ³⁰	— 112,0	+ 87,5	0,78
1 ⁴⁵	— 132,6	+ 105,4	0,79
2 ⁰⁰	— 155,0	+ 123,9	0,80
2 ¹⁵	— 178,4	+ 143,6	0,80
2 ³⁰	— 202,9	+ 164,7	0,81
2 ⁴⁵	— 226,7	+ 186,1	0,82
3 ⁰⁰	— 251,2	+ 208,1	0,83
3 ¹⁵	— 276,5	+ 231,3	0,84
3 ³⁰	— 301,3	+ 254,4	0,84
3 ⁴⁵	— 325,0	+ 276,7	0,85
4 ⁰⁰	— 346,4	+ 295,7	0,85

T a b e l a 14

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w wodzie destylowanej z dodatkiem M/400 azydki sodu

Bakterie wyhodowane w pożywce z glukozą
The endogenous respiration of *Ps. extorquens*, grown on glucose, in presence of M/400 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ¹⁵	— 8,5	+ 8,1	0,95
0 ³⁰	— 15,6	+ 15,0	0,96
0 ⁴⁵	— 22,6	+ 21,4	0,95
1 ⁰⁰	— 31,0	+ 28,8	0,93
1 ¹⁵	— 37,1	+ 34,3	0,92
1 ³⁰	— 43,0	+ 40,0	0,93
1 ⁴⁵	— 48,3	+ 44,9	0,93
2 ⁰⁰	— 53,9	+ 49,8	0,92
2 ¹⁵	— 59,4	+ 54,2	0,91
2 ³⁰	— 64,7	+ 58,6	0,91
2 ⁴⁵	— 69,3	+ 62,7	0,90
3 ⁰⁰	— 73,7	+ 66,7	0,91
3 ¹⁵	— 78,5	+ 70,6	0,90
3 ³⁰	— 82,3	+ 73,9	0,90
3 ⁴⁵	— 86,6	+ 77,8	0,90
4 ⁰⁰	— 90,8	+ 81,6	0,90

T a b e l a 15

Różnice w ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą i w wodzie destylowanej w obecności M/400 azydki sodu

The differences between uptake of oxygen and output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on glucose and on distilled water in presence of M/400 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l O}_2$ H_2O	różnica diffe- rence	$\mu\text{l CO}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l CO}_2$ H_2O	różnica diffe- rence	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—	—	—	—	—
0 ¹⁵	— 19,5	— 8,5	— 11,0	+ 15,0	+ 8,1	+ 6,9	0,63
0 ³⁰	— 37,8	— 15,6	— 22,2	+ 29,1	+ 15,0	+ 14,1	0,64
0 ⁴⁵	— 54,5	— 22,6	— 31,9	+ 41,1	+ 21,4	+ 19,7	0,62
1 ⁰⁰	— 72,8	— 31,0	— 41,8	+ 55,2	+ 28,8	+ 26,4	0,63
1 ¹⁵	— 92,3	— 37,1	— 55,2	+ 70,3	+ 34,3	+ 36,0	0,65
1 ³⁰	— 112,0	— 43,0	— 69,0	+ 87,5	+ 40,0	+ 47,5	0,69
1 ⁴⁵	— 132,6	— 48,3	— 84,3	+ 105,4	+ 44,9	+ 60,5	0,72
2 ⁰⁰	— 155,0	— 53,9	— 101,1	+ 123,9	+ 49,8	+ 74,1	0,73
2 ¹⁵	— 178,4	— 59,4	— 119,0	+ 143,6	+ 54,2	+ 89,4	0,75
2 ³⁰	— 202,9	— 64,7	— 138,2	+ 164,7	+ 58,6	+ 106,1	0,77
2 ⁴⁵	— 226,7	— 69,3	— 157,4	+ 186,1	+ 62,7	+ 123,4	0,78
3 ⁰⁰	— 251,2	— 73,7	— 177,5	+ 208,1	+ 66,7	+ 141,4	0,80
3 ¹⁵	— 276,5	— 78,5	— 198,0	+ 231,3	+ 70,6	+ 160,7	0,81
3 ³⁰	— 301,3	— 82,3	— 219,0	+ 254,4	+ 73,9	+ 180,5	0,82
3 ⁴⁵	— 325,0	— 86,6	— 238,4	+ 276,7	+ 77,8	+ 198,9	0,83
4 ⁰⁰	— 346,4	— 90,8	— 255,6	+ 295,7	+ 81,6	+ 214,1	0,84

T a b e l a 16

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą z dodatkiem M/200 azydki sodu

The respiration of *Ps. extorquens* on glucose in presence of M/200 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ¹⁵	— 17,5	+ 15,7	0,90
0 ³⁰	— 34,6	+ 29,5	0,85
0 ⁴⁵	— 49,5	+ 43,3	0,87
1 ⁰⁰	— 64,7	+ 57,0	0,88
1 ¹⁵	— 79,2	+ 70,1	0,89
1 ³⁰	— 93,5	+ 83,1	0,89
1 ⁴⁵	— 108,2	+ 95,5	0,88
2 ⁰⁰	— 123,5	+ 109,7	0,89
2 ¹⁵	— 138,0	+ 122,9	0,89
2 ³⁰	— 154,0	+ 137,1	0,89
2 ⁴⁵	— 168,6	+ 150,2	0,89
3 ⁰⁰	— 184,6	+ 162,9	0,88
3 ¹⁵	— 199,1	+ 176,2	0,88
3 ³⁰	— 213,8	+ 189,1	0,88
3 ⁴⁵	— 229,1	+ 203,2	0,89
4 ⁰⁰	— 244,3	+ 216,7	0,89

T a b e l a 17

Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w wodzie destylowanej z dodatkiem M/200 azydki sodu

Bakterie wyhodowane w pożywce z glukozą
The endogenous respiration of *Ps. extorquens*, grown on glucose, in presence of M/200 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$	$\mu\text{l CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—
0 ¹⁵	— 5,4	+ 5,8	1,07
0 ³⁰	— 11,9	+ 11,8	0,99
0 ⁴⁵	— 17,7	+ 17,4	0,98
1 ⁰⁰	— 23,3	+ 22,4	0,96
1 ¹⁵	— 28,7	+ 27,8	0,97
1 ³⁰	— 33,2	+ 32,3	0,97
1 ⁴⁵	— 39,0	+ 37,2	0,95
2 ⁰⁰	— 44,0	+ 42,1	0,96
2 ¹⁵	— 48,2	+ 45,8	0,95
2 ³⁰	— 52,1	+ 49,7	0,95
2 ⁴⁵	— 55,9	+ 53,2	0,95
3 ⁰⁰	— 60,5	+ 56,8	0,94
3 ¹⁵	— 65,1	+ 61,0	0,94
3 ³⁰	— 68,7	+ 64,1	0,93
3 ⁴⁵	— 72,1	+ 67,3	0,93
4 ⁰⁰	— 76,0	+ 70,8	0,93

T a b e l a 18

Różnice w ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą i w wodzie destylowanej w obecności M/200 azydki sodu
 The differences between uptake of oxygen and output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on glucose and on distilled water in presence of M/200 sodium azide

Czas time in hours	$\mu\text{l O}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l O}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\mu\text{l CO}_2$ pożywka substrate	$\mu\text{l CO}_2$ H ₂ O	różnica diffe- rence	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
0 ⁰⁰	—	—	—	—	—	—	—
0 ¹⁵	— 17,5	— 5,4	— 12,1	+ 15,7	+ 5,8	+ 9,9	0,82
0 ³⁰	— 34,6	— 11,9	— 22,7	+ 29,5	+ 11,8	+ 17,7	0,78
0 ⁴⁵	— 49,5	— 17,7	— 31,8	+ 43,3	+ 17,4	+ 25,9	0,81
1 ⁰⁰	— 64,7	— 23,3	— 41,4	+ 57,0	+ 22,4	+ 34,6	0,84
1 ¹⁵	— 79,2	— 28,7	— 50,5	+ 70,1	+ 27,8	+ 42,3	0,84
1 ³⁰	— 93,5	— 33,2	— 60,3	+ 83,1	+ 32,3	+ 50,8	0,84
1 ⁴⁵	— 108,2	— 39,0	— 69,2	+ 95,5	+ 37,2	+ 58,3	0,84
2 ⁰⁰	— 123,5	— 44,0	— 79,5	+ 109,7	+ 42,1	+ 67,6	0,85
2 ¹⁵	— 138,0	— 48,2	— 89,8	+ 122,9	+ 45,8	+ 77,1	0,86
2 ³⁰	— 154,0	— 52,1	— 101,9	+ 137,1	+ 49,7	+ 87,4	0,86
2 ⁴⁵	— 168,6	— 55,9	— 112,7	+ 150,2	+ 53,2	+ 97,0	0,86
3 ⁰⁰	— 184,6	— 60,5	— 124,1	+ 162,9	+ 56,8	+ 106,1	0,85
3 ¹⁵	— 199,1	— 65,1	— 134,0	+ 176,2	+ 61,0	+ 115,2	0,86
3 ³⁰	— 213,8	— 68,7	— 145,1	+ 189,1	+ 64,1	+ 125,0	0,86
3 ⁴⁵	— 229,1	— 72,1	— 157,0	+ 203,2	+ 67,3	+ 135,9	0,87
4 ⁰⁰	— 244,3	— 76,0	— 168,3	+ 216,7	+ 70,8	+ 145,9	0,87

silniej), jeżeli bakterie, które podczas pomiaru znajdowały się w wodzie destylowanej, wyrosły w pożywce z glukozą. Współczynnik oddechowy po czterech godzinach od początku doświadczenia w pierwszym wypadku

wzrósł od wartości 0,19 do 0,59, w drugim od wartości 0,78 do 0,90. Z powyższego wynika, iż metabolizm bakterii ograniczonych do

Wykres IV. Pobieranie tlenu przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą i w wodzie destylowanej
The uptake of oxygen by *Ps. extorquens* on glucose and in distilled water

- 1 — pobieranie tlenu w pożywce z glukozą
the uptake of oxygen on glucose
- 2 — pobieranie tlenu w pożywce z glukozą z dodatkiem M/600 azydku sodu
the uptake of oxygen on glucose in presence of M/600 sodium azide
- 3 — pobieranie tlenu w pożywce z glukozą z dodatkiem M/400 azydku sodu
the uptake of oxygen on glucose in presence of M/400 sodium azide
- 4 — pobieranie tlenu w pożywce z glukozą z dodatkiem M/200 azydku sodu
the uptake of oxygen on glucose in presence of M/200 sodium azide
- 1a — pobieranie tlenu w wodzie destylowanej
the uptake of oxygen in distilled water
- 2a — pobieranie tlenu w wodzie destylowanej z dodatkiem M/600 azydku sodu
the uptake of oxygen in distilled water in presence of M/600 sodium azide
- 3a — pobieranie tlenu w wodzie destylowanej z dodatkiem M/400 azydku sodu
the uptake of oxygen in distilled water in presence of M/400 sodium azide
- 4a — pobieranie tlenu w wodzie destylowanej z dodatkiem M/200 azydku sodu
the uptake of oxygen in distilled water in presence of M/200 sodium azide

spalania substancji komórkowych uzależniony jest od typu reakcji katalizowanych w okresie normalnego wzrostu.

Celem jaśniejszego przedstawienia, jak działają różne stężenia azydku sodu na pobieranie tlenu i wydzielanie CO_2 przez bakterie znajdujące się w pożywce z glukozą, w wodzie destylowanej, oraz uwzględniając tylko samo utlenianie glukozy, na podstawie tabel 6, 12, 15 i 17, zrobiono szereg wykresów.

Wykres IV obrazuje pobieranie tlenu w μl przez bakterie znajdujące się w pożywce z glukozą oraz w wodzie destylowanej, przy różnych stężeniach azydku. Z przebiegu krzywej 1 (pobieranie tlenu przez bakterie

niezatrute) wynika, że natężenie procesu utleniania glukozy, z początku silniejsze, po godzinie zaczyna powoli słabnąć. Dodanie do pożywki z glukozą azydku sodu w stężeniu M/600 (krzywa 2) wpływa na zwiększenie ilości pobieranego tlenu, przy czym natężenie procesu utleniania również słabnie, lecz mniej niż przy bakteriach niezatrutych. Większe stężenie azydku powoduje z początku zmniejszenie ilości pobieranego tlenu (krzywa 3 w porównaniu z krzywą 1), ponieważ jednak pobieranie to jest raczej równomierne, po czterech godzinach ogólna ilość pobranego tlenu jest większa niż przy bakteriach niezatrutych. Największe stosowane stężenie azydku wpływa jeszcze bardziej hamująco na pobieranie tlenu, ale z przebiegu krzywej 4 wynika, iż po pewnym czasie może ona przeciąć krzywą 1 i ostatecznie ilość pobranego tlenu może znowu przewyższyć ilość pobraną przez bakterie oddychające w pożywce z glukozą bez azydku. Na tym samym wykresie przedstawiono pobieranie tlenu przez bakterie wyhodowane w pożywce z glukozą znajdujące się w wodzie destylowanej. Pobieranie tlenu przez bakterie niezatrute, dużo słabsze niż w pożywce z glukozą, mimo to jednak dość znaczne, odbywało się raczej równomiernie (krzywa 1a). Dodanie azydku sodu w stężeniu 1/600 molarnym spowodowało największe zahamowanie pobierania tlenu (krzywa 2a), wynik doświadczenia trudny do objaśnienia. Stężenie azydku M/400 od początku do końca pomiarów działało stymulująco (krzywa 3a), stężenie M/200 — hamująco (krzywa 4a).

Wykres V obrazuje wydzielanie dwutlenku węgla w μ l przez bakterie znajdujące się w pożywce z glukozą oraz w wodzie destylowanej przy różnych stężeniach azydku. Z przebiegu krzywej 1 (bakterie niezatrute) wynika, że wydzielanie dwutlenku węgla, z początku dość równomierne, w czwartej godzinie wyraźnie słabnie. Dodanie azydku sodu w stężeniu M/600 powoduje bardzo silne zwiększanie ilości wydzielonego dwutlenku (krzywa 2), z tym, że po dwóch godzinach proces ten zaczyna słabnąć. Większe stężenie azydku — M/400 początkowo prawie nie wpływa na wydzielanie CO_2 , po 1,5 godzinie zaczyna działać stymulująco, a ponieważ w tym wypadku wydzielanie odbywa się równomiernie, po czterech godzinach ogólna ilość dwutlenku jest większa niż przy bakteriach niezatrutych lub zatrutych mniejszym stężeniem azydku. Azydek w stężeniu M/200 również początkowo nie wpływa na wydzielanie dwutlenku, po 1 godz. i 15 minutach zaczyna działać hamująco. Krzywa 4 po 3 godz. i 45 min. przecina krzywą 1, tak że ogólna ilość wydzielonego dwutlenku węgla w okresie 4 godzin, nawet przy największym stężeniu azydku, jest większa niż ilość CO_2 wydzielonego przez bakterie niezatrute. Krzywe przedstawiające wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie wyhodowane w pożywce z glukozą, a w okresie pomiaru znajdujące się w wodzie destylowanej, są bardzo zbliżone do analogicznych krzywych pobie-

rania tlenu. Hamująco na wydzielanie dwutlenku węgla działa tylko najmniejsze stężenie azydku, większe stężenie działa stymulująco, największe słabiej stymulująco.

Wykres V. Wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* w pożywce z glukozą i w wodzie destylowanej

The output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on glucose and in distilled water

Na wykresie VI przedstawiono pobieranie tlenu związane tylko z samym utlenianiem glukozy. Pobieranie tlenu przez bakterie niezatrute obrazuje krzywa 1. Po godzinie i 15 minutach od początku doświadczenia zaczyna się osłabienie w pobieraniu tlenu, które trwa aż do ostatniego pomiaru. Dodanie najmniejszego stosowanego stężenia azydku — M/600 powoduje bardzo wyraźne zwiększenie pobierania tlenu, a lekki spadek w natężeniu tego procesu rozpoczyna się po dwóch godzinach (krzywa 2). Drugie kolejne stężenie azydku M/400 z początku działa silnie hamująco, ponieważ jednak w tym wypadku natężenie procesu pobierania tlenu z biegiem czasu wzrasta, ogólna ilość tlenu pobrana w okresie czterech godzin jest znacznie większa niż przy bakteriach niezatrutych (krzywa 3). Największe stężenie azydku — M/200 jeszcze silniej hamuje pobieranie

1 — wydzielanie dwutlenku węgla w pożywce z glukozą

the output of carbon dioxide on glucose

2 — wydzielanie dwutlenku węgla w pożywce z glukozą z dodatkiem M/600 azydki sodu

the output of carbon dioxide on glucose in presence of M/600 sodium azide

3 — wydzielanie dwutlenku węgla w pożywce z glukozą z dodatkiem M/400 azydki sodu

the output of carbon dioxide on glucose in presence of M/400 sodium azide

4 — wydzielanie dwutlenku węgla w pożywce z glukozą z dodatkiem M/200 azydki sodu

the output of carbon dioxide on glucose in presence of M/200 sodium azide

1a — wydzielanie dwutlenku węgla w wodzie destylowanej

the output of carbon dioxide in distilled water

2a — wydzielanie dwutlenku węgla w wodzie destylowanej z dodatkiem M/600 azydki sodu

the output of carbon dioxide in distilled water in presence of M/600 sodium azide

3a — wydzielanie dwutlenku węgla w wodzie destylowanej z dodatkiem M/400 azydki sodu

the output of carbon dioxide in distilled water in presence of M/400 sodium azide

4a — wydzielanie dwutlenku węgla w wodzie destylowanej z dodatkiem M/200 azydki sodu

the output of carbon dioxide in distilled water in presence of M/200 sodium azide

Wykres VI. Pobieranie tlenu przez *Ps. extorquens* związane z samym utlenianiem glukozy
The differences between uptake of oxygen by *Ps. extorquens* on glucose and in distilled water

- 1 — pobieranie tlenu — the uptake of oxygen
- 2 — pobieranie tlenu przez bakterie zatrute azydkiem sodu w stężeniu M/600
the uptake of oxygen in presence of M/600 sodium azide
- 3 — pobieranie tlenu przez bakterie zatrute azydkiem sodu w stężeniu M/400
the uptake of oxygen in presence of M/400 sodium azide
- 4 — pobieranie tlenu przez bakterie zatrute azydkiem sodu w stężeniu M/200
the uptake of oxygen in presence of M/200 sodium azide

tlenu niż stężenie M/400, ale i tutaj ilości tlenu pobierane w równych odstępach czasu są coraz większe (krzywa 4).

Na wykresie VII przedstawiono wydzielanie dwutlenku węgla związane z samym utlenianiem glukozy. Wydzielanie to (krzywa 1) odbywa się z początku równomiernie, po trzech godzinach i 15 minutach słabnie.

Wykres VII. Wydzielanie dwutlenku węgla przez *Ps. extorquens* związane z samym utlenianiem glukozy

The differences between output of carbon dioxide by *Ps. extorquens* on glucose and in distilled water

- 1 — wydzielanie dwutlenku węgla
the output of carbon dioxide
- 2 — wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie zatrute azydkiem sodu w stężeniu M/600
the output of carbon dioxide in presence of M/600 sodium azide
- 3 — wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie zatrute azydkiem sodu w stężeniu M/400
the output of carbon dioxide in presence of M/400 sodium azide
- 4 — wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie zatrute azydkiem sodu w stężeniu M/200
the output of carbon dioxide in presence of M/200 sodium azide

Azydek w stężeniu M/600 powoduje znaczne zwiększenie wydzielania CO_2 , tym niemniej natężenie procesu słabnie po 2 godzinach i 15 minutach (krzywa 2). Większe stężenie azydki wpływa z początku hamująco, lecz po 1,5 godzinie intensywność wydzielania dwutlenku wzrasta tak, że po czterech godzinach ogólna ilość dwutlenku węgla jest prawie taka sama, jak przy słabszym stężeniu azydki (krzywa 3). Maksymalne stosowane stężenie azydki, tzn. M/200, powoduje lekkie osłabienie procesu wydzielania dwutlenku i w tym jednym wypadku proces przebiega równomiernie, tak że pod koniec doświadczenia ogólna ilość wydzielonego dwutlenku węgla jest prawie taka, jak przy bakteriach niezatrutych (krzywa 4).

Z wyżej opisanych doświadczeń, które miały na celu zbadanie wpływu azydki sodu na metabolizm *Pseudomonas extorquens* w pożywce z glukozą, można wyprowadzić wniosek, że mniejsze stężenia trucizny stymulują wymianę gazową, większe zaś hamują, przy czym to samo stężenie azydki silniej hamuje pobieranie tlenu niż wydzielanie dwutlenku węgla.

DYSKUSJA

Celem opisanej pracy, jak zostało zaznaczone w części teoretycznej, było kontynuowanie badań nad metabolizmem *Pseudomonas extorquens* rozpoczętych przez Bassalika oraz ewentualne potwierdzenie nowszymi metodami pracy słuszności hipotezy, że bakterie te są zdolne do redukcji dwutlenku węgla.

Z powodu niemożności zastosowania metody izotopowej, dzięki której można bezpośrednio sprawdzić występowanie w składnikach bakteryjnych węgla pochodzącego z dwutlenku węgla względnie ze szczawianu, ograniczono się do pomiarów gazowych metodą Warburga.

Co do ścisłości wyników otrzymywanych tą metodą istnieją słuszne zastrzeżenia, jednakże daje ona pewne możliwości poznania metabolizmu badanego obiektu.

Ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez bakterie są to ilości związane z procesami katabolicznymi i procesami anabolicznymi. Proces utleniania jakiegoś związku przez dany organizm nie tylko dostarcza mu koniecznej do życia energii, ale również produkty pośrednie tego rozkładu stanowią materiały wyjściowe do syntezy. Jeżeli np. kwas pyrogronowy, powstały z rozkładu jakiegoś związku utlenianego, da w wyniku β -karboksylacji kwas szczawiooctowy (jedna z początkowych reakcji procesu syntezy) przy tej samej ilości pobranego tlenu, zmniejszy się ilość wydzielonego dwutlenku węgla. Zmniejszenie to zresztą nastąpi również bez wiązania dwutlenku węgla w wypadku, gdy pew-

ne produkty pośrednie powstałe w wyniku procesów katabolicznych nie zostaną spalone całkowicie do dwutlenku węgla i wody. Poza tym, jeżeli w doświadczeniu nie stosuje się oczyszczonego preparatu enzymatycznego, a zawiesinę bakteryjną, utleniany jest nie tylko podany substrat, lecz również zapasowe materiały komórkowe i produkty autolizy martwych komórek.

W opisaney pracy starano się w pierwszym rzędzie ustalić współczynnik oddechowy dla badanych bakterii w pożywce ze szczawianem i w pożywce z glukozą. W jednym i w drugim wypadku stwierdzone współczynniki były niższe niż wynikało z wyliczenia teoretycznego. Jednak gdy przy utlenianiu glukozy różnica ta była niezbyt wysoka (po czterech godzinach od początku doświadczenia $RQ = 0,73$, teoretycznie wyliczony współczynnik = 1), przy utlenianiu kwasu szczawiowego znaleziony współczynnik był niespodziewanie niski (po ośmiu godzinach od początku doświadczenia $RQ = 0,57$, teoretycznie wyliczony współczynnik = 4).

Ponieważ do doświadczeń używano zawiesinę bakteryjną, w celu stwierdzenia, jakie ilości gazów są związane z przemianą materiałów komórkowych i produktów autolizy, oznaczono ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się w wodzie destylowanej. Okazało się, że wyniki tego doświadczenia zależały od tego, w jakiej pożywce bakterie wyrosły. Jeżeli bakterie były wyhodowane w pożywce z glukozą, współczynnik oddechowy przy pomiarach w wodzie destylowanej ustalił się przy wartości 0,78, a więc był zbliżony do współczynnika utleniania glukozy. Jeżeli natomiast bakterie były wyhodowane w pożywce ze szczawianem, współczynnik oddechowy przy pomiarach w wodzie destylowanej był niespodziewanie niski, po ośmiu godzinach osiągnął maksymalną swą wartość 0,41, a przez pierwsze dwie i pół godziny dwutlenek był nawet pobierany.

Wydaje się, że te różnice można wytłumaczyć jedynie różnym metabolizmem bakterii utleniających glukozę i utleniających szczawian, działalnością innych enzymów, które mimo iż pozbawione substratu zewnątrzkomórkowego, a ograniczone do substratu wewnątrzkomórkowego, katalizują dalej ten sam typ reakcji. Wydaje się również, że wyraźne wiązanie CO_2 w pierwszym okresie doświadczenia przez bakterie, które poprzednio jako substrat miały kwas szczawiowy, jest dowodem tego, że wiążą one normalnie dwutlenek węgla przy utlenianiu szczawianów.

Pobieranie dwutlenku węgla przez *Pseudomonas extorquens* w wodzie możliwe było do stwierdzenia przy zastosowaniu metody Warburga, gdyż metoda ta polega na określaniu wymiany gazowej stosunkowo dużej ilości żywego materiału (w pracy niniejszej w jednym naczyniu Warburga znajdowało się około 10 mg suchej masy bakteryjnej). Określając natomiast gazy pobierane i wydzielane przez bakterie szczepione w nie-

wielkich ilościach, ilość pobieranego dwutlenku węgla jest nie do uchwycenia.

Powstaje teraz zagadnienie, czy wystarczająca jest ilość energii wyzwolonej przy utlenianiu materiałów komórkowych i produktów autolizy do redukcji CO_2 .

Pewne dane przemawiające za tym uzyskano przez otrzymanie wyraźnego wzrostu bakterii w pożywkach zawierających jako jedyne źródło węgla tylko nieorganiczne węglany lub dwutlenek z powietrza. Należy przy tym zaznaczyć, że — jak to podano już w opisie doświadczenia — nie stwierdzono, stosując przytoczone metody, ani utleniania związków siarki, ani utleniania soli amonowych. W tym wypadku zachodzi możliwość, że jedynym źródłem energii mogło być utlenienie wprowadzonego, zautolizowanego materiału bakteryjnego przy szczepieniu. Jednakże ta część doświadczeń wymaga dokładniejszego opracowania i stanowi punkt wyjścia do dalszych badań.

W celu oznaczenia wymiany gazowej bakterii związanej z przemianą samego substratu podanego w doświadczeniu, tj. szczawianu lub glukozy, od ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla w pożywce odjęto ilości pobranego tlenu i wydzielonego dwutlenku węgla w wodzie destylowanej. Stwierdzono, że współczynnik oddechowy związany z samym utlenianiem glukozy jest nieco niższy niż współczynnik oddechowy związany z utlenianiem glukozy i materiałów komórkowych. Natomiast współczynnik oddechowy związany z samym utlenianiem szczawianu jest o wiele wyższy niż współczynnik związany z utlenianiem szczawianu i materiałów komórkowych (wartość jego w pierwszych godzinach pomiaru waha się około 2). Prawdliwość powyższych przeliczeń jest uzależniona od tego, czy dodanie łatwo zużywanego substratu (w pracy niniejszej szczawianu i glukozy) nie wpływa na obniżenie wymiany gazowej komórek zawieszonych w wodzie. Metoda manometryczna jest niewystarczająca dla określenia „oddychania endogennego“ w obecności substratu. Oddychanie to może natomiast być określone przy zastosowaniu techniki izotopowej według metody zaproponowanej w 1949 r. przez Burrisa, a zastosowanej przez Cochran'e'a i Gibbsa (1951), którzy badając metabolizm *Streptomyces coelicolor* stwierdzili, że utlenianie glukozy czy pyrogronianu nie wpływa na „oddychanie endogenne“. Wynik ich pracy nie przesądza naturalnie, że utlenianie glukozy, czy szczawianu nie wpływa na „oddychanie endogenne“ *Ps. extorquens*, stanowi jednak pewną sugestię w tym kierunku wymagającą sprawdzenia z chwilą udostępnienia w naszych badaniach związków zawierających węgiel izotopowy.

Jak zostało już na początku dyskusji podkreślone, procesy oddychania i syntezy są ściśle ze sobą skojarzone. Powiązanie to występuje wyraź-

niej, jeśli zwróci się uwagę na fakt, że cały szereg związków trujących dla organizmów takich, jak fluorek sodu, cyjanek potasu, jodooctan, azydek sodu, 2,4-dwunitrofenol i inne działają hamująco tak na oddychanie jak i na syntezę. Jednak, jak wynika z literatury, te same stężenia danej trucizny słabiej hamują oddychanie, silniej natomiast syntezę, istnieją zaś stężenia „krytyczne“, które całkowicie hamują syntezę, częściowo tylko osłabiając oddychanie.

Opierając się na powyższych danych z literatury, w opisanej pracy starano się w oznaczeniach metodą Warburga chociaż częściowo wyeliminować procesy syntezy i w ten sposób uzyskać więcej danych dotyczących metabolizmu badanych bakterii. Przeprowadzono przy tym następujące rozumowanie. Jeżeli rzeczywiście zastosowany związek trujący będzie hamował silniej proces syntezy niż proces utleniania, współczynnik oddechowy ulegnie zwiększeniu. Gdyby udało się znaleźć wyżej wspomniane stężenie „krytyczne“ trucizny i zastosować je do oznaczeń metodą Warburga, wtedy przy całkowitym spalaniu badanego związku współczynnik otrzymany powinien być równy wyliczonemu teoretycznie.

Ponieważ, jak wynika z prac np. Picketta, Cliftona (1941, 1942) oraz Winzlera (1940), działanie związku trującego zależy od organizmu, na który działa, i od substratu rozkładanego przez dany organizm, nie można było z góry przewidzieć, który ze związków trujących i w jakim stężeniu całkowicie zahamuje syntezę bakteryjną, a częściowo tylko osłabi oddychanie.

Jako związek trujący wybrano azydek sodu, który stosowano w stężeniu 1/600, 1/400 i 1/200 molarnym. Stwierdzono przede wszystkim, że działanie azydku zależy nie tylko od substratu w czasie oznaczania, ale i od pożywki, w której bakterie zostały wyhodowane. Poza tym stwierdzono we wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach, że dodanie azydku sodu wpływa na zwiększenie współczynnika oddechowego. Zgodnie więc z postawionym założeniem proces syntezy był hamowany silniej.

Azydek w stężeniu 1/400 molarnym zahamował częściowo pobieranie tlenu i zwiększył wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się w wodzie destylowanej, wyhodowane w pożywce ze szczawianem. To samo stężenie azydku działało stymulująco zarówno na pobieranie tlenu, jak i na wydzielanie dwutlenku węgla (na wydzielanie dwutlenku silniej), w wypadku gdy bakterie, które podczas pomiaru znajdowały się w wodzie destylowanej, wyrosły w pożywce z glukozą.

Azydek w stężeniu 1/400 molarnym silnie zahamował pobieranie tlenu, a słabo (dopiero po przeszło trzech godzinach) wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się w czasie pomiaru w pożywce ze szczawianem. To samo stężenie azydku w wypadku bakterii znajdujących się w czasie pomiaru w pożywce z glukozą, tylko początkowo działało

lekko hamująco, a wydzielanie dwutlenku węgla po dwóch godzinach silnie stymulowało.

Porównując działanie różnych stężeń azydku w doświadczeniach na glukozie można stwierdzić, że mniejsze jego stężenia i na pobieranie tlenu i na wydzielanie dwutlenku węgla działają stymulująco, większe zaś hamująco. Przy czym to samo stężenie azydku silniej hamuje pobieranie tlenu niż wydzielanie dwutlenku węgla. Również w tej serii doświadczeń zauważono, że po pewnym czasie wymiana gazowa w pożywce z glukozą słabnie, mimo iż glukoza jest podana w nadmiarze. Azydek sodu wpływa w ten sposób, że natężenie pobierania tlenu i wydzielania dwutlenku węgla utrzymuje się na stałym poziomie, względnie nawet wzrasta. Obserwacja ta jest podobna do wyników badań Cliftona nad utlenianiem octanu przez *Pseudomonas calco-acetica*. Stwierdził on, że pobieranie tlenu przez tę bakterię odbywa się z mniej więcej tym samym natężeniem do momentu, kiedy ilość tlenu pobrana wynosi około 2/3 ilości potrzebnej do całkowitego spalania danej ilości octanu. Następnie natężenie to nagle spada. Clifton wykluczył możliwość następujących wyjaśnień opisanego faktu:

1. stężenie substratu spadło do poziomu, przy którym pobieranie tlenu jest tak niskie, że trudne do zmierzenia,
2. działalność enzymatyczna komórek została zniszczona,
3. w pożywce nagromadziły się produkty rozkładu działające hamująco na utlenianie,
4. niekorzystny wpływ zmienionego stężenia jonów wodorowych.

Zmniejszenie natężenia pobierania tlenu Clifton tłumaczył nie całkowitym spalaniem substratu, a utlenianiem do produktów zużytych następnie w procesach syntezy. Zastosowanie odpowiednich trucizn przez Cliftona doprowadziło do tego, że jego bakterie pobrały 90% tlenu wyliczonego teoretycznie.

Jak zostało już zaznaczone na początku dyskusji, dokładniejsze wyjaśnienie metabolizmu bakterii *Ps. extorquens* byłoby możliwe przy zastosowaniu techniki izotopowej. Poza tym, jak zostało stwierdzone w niniejszej pracy, celem wyeliminowania reakcji ubocznych zaciemniających rozkład danego substratu należałoby pracować z oczyszczonymi preparatami enzymatycznymi. Jednakże zastosowanie metody pomiarów gazowych Warburga pozwoliło na otrzymanie pewnych danych potwierdzających hipotezę Bassalika odnośnie zdolności wiązania dwutlenku węgla przez *Pseudomonas extorquens*, danych przemawiających za tym, że metabolizm tych samych bakterii zależny jest od pożywki, w której są one hodowane, oraz danych potwierdzających całkowitą łączność procesów rozkładu i syntezy.

WNIOSKI

1. Współczynnik oddechowy *Pseudomonas extorquens* w pożywce ze szczawianem wzrasta od 0,28 do 0,61 po ośmiu godzinach pomiarów, w pożywce z glukozą od 0,58 do 0,73 po czterech godzinach pomiarów.

2. Wymiana gazowa *Ps. extorquens* w wodzie destylowanej zależy od tego, w jakiej pożywce bakterie wyrosły. Jeżeli hodowlę prowadzono w pożywce ze szczawianem, wówczas ich współczynnik oddechowy w wodzie destylowanej jest początkowo ujemny (dwutlenek węgla jest pobierany), po ośmiu godzinach dochodzi do wartości 0,41. Jeżeli hodowlę prowadzono w pożywce z glukozą, to ich współczynnik oddechowy w wodzie destylowanej spadł od wartości 0,91 do 0,78 po czterech godzinach pomiarów.

3. Współczynnik oddechowy przy utlenianiu szczawianów w pierwszych dwóch godzinach dochodzi do około 1. Współczynnik oddechowy przy utlenianiu glukozy wzrasta od wartości 0,36 do 0,72 po czterech godzinach.

4. Działanie azydku sodu na wymianę gazową *Ps. extorquens* zależy od pożywki, w której bakterie wyrosły, oraz od stężenia azydku.

- a) Azydek w stężeniu 1/200 molarnym hamuje pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się na glukozie.
- b) W wypadku wyrośnięcia bakterii w pożywce ze szczawianem azydek w stężeniu 1/400 molarnym hamuje pobieranie przez nie tlenu i zwiększa wydzielanie dwutlenku węgla w wodzie destylowanej. W wypadku wyrośnięcia bakterii w pożywce z glukozą to samo stężenie azydku stymuluje pobieranie przez nie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla w wodzie destylowanej.
- c) Azydek w stężeniu 1/400 molarnym silnie hamuje pobieranie tlenu, słabo — wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się na szczawianie. To samo stężenie azydku początkowo lekko hamuje, następnie stymuluje pobieranie tlenu, stymuluje silnie po dwóch godzinach wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się na glukozie.
- d) Azydek w stężeniu 1/600 molarnym silnie stymuluje pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla przez bakterie znajdujące się na glukozie.

5. We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach azydek sodu wpływał na zwiększenie współczynnika oddechowego.

6. Bakterie *Ps. extorquens* są zdolne do wiązania nieorganicznego dwutlenku węgla.

Panu prof. drowi K. B a s s a l i k o w i składam serdeczne podziękowanie za cenne rady i wskazówki udzielane mi w czasie wykonywania niniejszej pracy.

S U M M A R Y

I. It was the aim of the present work to pursue further the studies on metabolism in *Pseudomonas extorquens* started by K. Bassalik. *Pseudomonas extorquens* was the first species of bacteria, capable of utilizing oxalic acid as the only carbon source, to be isolated and investigated.

II. The strain of *Ps. extorquens* used in the present investigation was not derived from the original culture which perished in the autumn of 1939, but was isolated by the authoress in 1948 from the soil of the garden belonging to the Department of Plant Physiology of the Warsaw University. Morphologically and physiologically this strain was exactly similar to the one isolated for the first time in 1909 by K. Bassalik from the excrements of earth worms from the Botanical Garden in Bâsle.

III. The experimental procedure consisted in measuring with Warburg's method the volume of oxygen absorbed and of carbon dioxide evolved as *Ps. extorquens* bacteria oxidized oxalic acid or glucose. Moreover, measurements were made of the gaseous exchange involved in endogenous respiration. Bacteria which were to be used in respiration tests in ammonium oxalate were cultivated in the liquid Medium A, which in one litre of distilled water contained:

K_2HPO_4	—	0,5	grams
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0,1	grams
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0,02	grams
NaCl	—	0,3	grams
$(COO)_2(NH_4)_2$	—	1,2	grams

Bacteria for respiration tests in glucose medium were cultivated for this purpose in the liquid Medium B, which contained in one litre of distilled water:

meat extract	—	3	grams
peptone	—	5	grams
glucose	—	20	grams

The cultures were allowed to grow in a temperature of 27°C during 11—12 days. To neutralize the medium alkalized with ammonium oxalate some oxalic acid was added. After this time the bacteria were removed from the medium by centrifugation, washed out with distilled water, and left standing in distilled water for 24 hours, at a temperature of about 0°C. Then the bacteria were washed again with distilled water centrifuged, and the damp mass was placed in a Warburg's glass and vacuum dried at room temperature to absolute dryness. Much care was taken to use for respiration measurements the same quantities of bacteria each time, and all results were computed for 10 milligrams of dry matter. The medium used during measurements was the same as in the cultures, and 2 millilitres of it were added to each glass. For absorbing carbon dioxide 0,2 molar 20 per cent KOH was used.

IV. To obtain fuller information on the metabolism of the bacteria an attempt was made to eliminate the effect of the processes in which the cell material was produced. In this series of experiments, therefore, the

gaseous exchange of bacteria poisoned with sodium azide was measured. 1/600, 1/400, and 1/200 molar solutions of the poison were used.

V From these experiments the following results were obtained:

1) The respiration quotient of *Ps. extorquens* in the oxalate medium increased during 8 hours of observation from 0,28 to 0,61 (Table 1). During 4 hours of observation the respiration quotient in the glucose containing medium increased from 0,58 to 0,73 (Table 4).

2) The gaseous exchange involved in endogenous respiration of bacteria depended on the medium on which the bacteria had been cultivated. Bacteria grown on the oxalate medium consumed carbon dioxide during the first two hours, and after four hours their respiration quotient was 0,187 (Table 2). Bacteria grown on the glucose medium evolved carbon dioxide in distilled water from the first and after four hours of observation their respiration quotient was 0,78 (Table 5).

3) In the case of *Ps. extorquens* the respiration quotient involved in oxidization processes solely of the oxalate, or solely of glucose, (inclusive of endogenous respiration) were lower than might have been expected on the basis of theoretical considerations. However, when glucose was oxidized the respiration quotient after four hours of observation was 0,72 (Table 6), while in the case of oxalate oxidization after the same time the quotient was 1,01 (Table 3), which was only one fourth of the value obtained from the equation for complete oxalate oxidization (4,0).

4) The effect of sodium azide on the gaseous exchange in *Ps. extorquens* depended on the substrate added to the bacteria during the experiment. (The data refer to the difference between the volumes of oxygen consumed and carbon dioxide evolved in the medium and in distilled water after four hours of observation).

a) A 1/400 molar concentration of sodium azide increased the oxygen consumption and the carbon dioxide liberation when glucose was oxidized by the bacteria.

b) The same sodium azide concentration reduced oxygen consumption and carbon dioxide liberation by 49,27 and 36,1 per cent respectively when the oxalate was oxidized by the bacteria.

5) The effect of sodium azide depended on the medium in which bacteria were cultivated. (The data refer to the volumes of gases involved in endogenous respiration of bacteria grown on the two kinds of media after four hours).

a) In bacteria grown on the glucose medium sodium azide in 1/400 molar concentration increased oxygen consumption and carbon dioxide liberation by 9,7 and 26,7 per cent respectively (Tables 5 and 14, Diagrams IV and V).

b) In bacteria grown on the oxalate medium the same sodium azide concentration reduced oxygen consumption and carbon dioxide liberation by 33,7 and 108 per cent respectively (Tables 2 and 8, Diagrams I and II).

6) The influence of sodium azide on the gaseous exchange in *Ps. extorquens* depended on concentration. (The data refer to the difference between the volumes of oxygen consumed and carbon dioxide evolved in a glucose containing medium in distilled water after four hours of observation).

- a) 1/600 molar sodium azide concentration increased oxygen consumption and carbon dioxide liberation by 36,1 and 48,5 per cent respectively (Tables 6 and 12, Diagrams VI and VII).
 - b) 1/400 molar sodium azide concentration increased oxygen consumption and carbon dioxide liberation by 23,4 and 44,3 per cent respectively (Tables 6 and 15, Diagrams VI and VII).
 - c) 1/200 molar sodium azide concentration increased oxygen consumption and carbon dioxide liberation by 18,7 and 2 per cent respectively (Tables 6 and 18, Diagrams VI and VII).
- 7) One given concentration inhibited more the oxygen consumption than the evolution of carbon dioxide, and this increased the value of the respiration quotient.
- 8) *Ps. extorquens* is capable of fixing inorganic carbon dioxide, and this has been demonstrated directly on bacteria grown on an oxalate containing medium by measuring the gaseous exchange of such bacteria in distilled water.

L I T E R A T U R A

- Bassalik K., 1913, Jahrb. wiss. Botan., 53, 255.
- Barker H. A., 1936, J. Cellular. Comp. Physiol., 8, 231.
- Bhat J. V., Barker H. A., 1948, J. Bact., 55, 359.
- Clifton C. E., 1937, Enzymologia 4, 246.
- Cochrane V. W., Gibbs M., 1951, J. Bact., 61, 305.
- Giesberger G., 1936, „Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Spirillum* Ehb. — Univ. Utrecht.
- Janota L., 1950, Medycyna doświadczalna i Mikrobiologia, 2, 131.
- Jayasuriya G. C. N., 1954, J. Gen. Micr., 10, VI.
- Lardy H. A., Elvehjem C. A., 1945, Ann. Rev. Bioch., 14, 1.
- Van Niel C. B., 1940, „The Cell and Protoplasm“ in „the Biochemistry of Microorg. and approach to General and Comparative Biochemistry“, Am. Assoc. Advancement Sci. Pub. nr. 14, Science Press 106.
- Pickett M. J., Clifton C. E., 1941, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 46, 443.
- Pickett M. J., Clifton C. E., 1943, J. Cellular Comp. Physiol., 22, 147.
- Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. E., 1948, U. S. A. „Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism“.
- Winzler R. J., 1940, J. Cellular Comp. Physiol., 15, 343.