

ÚČINOK CHLÓROVANÉHO VAJEČNÉHO ALBUMÍNU NA MIKROORGANIZMY

J. VAŠÁTKO, E. STANKOVIČ

ČSAV, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Úvod

Baktericídny účinok chlóru a chlóróvého vápna je vo všeobecnosti známy. Ukázalo sa, že baktericídny účinok majú aj mnohé iné organické zlúčeniny s obsahom aktívneho chlóru viazaného na dusík. Takouto organickou zlúčeninou je napríklad chlórámín T.

V našej práci sme sa zamerali na účinok chlóróvaného vaječného albumínu, ktorý ako sme v predchádzajúcich pokusoch dokázali, obsahuje i aktívny chlór viazaný na dusík (J. Vašátko, E. Stankovič [1]). Zároveň sme pripravili chlóróvaný vaječný albumín s vyšším obsahom aktívneho chlóru, čo sme dosiahli rýchlejšim vysušením prípravku v prúde vzduchu.

Experimentálna časť

Metódy a materiál

Príprava chlóróvaného vaječného albumínu

Chlóróvaný vaječný albumín sme pripravili zavádzaním chlóru z bomby do 10 % roztoku vaječného albumínu vo vode. Vychádzali sme z 30 g vaječného albumínu. Chlór sme zavádzali tak, aby roztokom prechádzali dve bubliny za jednu sekundu. Doba chlórovania bola 16 hodín. Po zastavení chlorácie zmes obsahovala voľný chlór. Vaječný albumín, pôvodne rozpustený vo vode, po chlorácii prešiel do nerozpustného stavu a ponechal sa v roztoku chlóróvej vody 7 dní. Po siedmich dňoch roztok obsahoval ešte voľný nezreagovaný chlór, ktorý sme zistili podľa odfarbovania metyloranže. Získaný preparát sme ďalej premyli niekoľkokrát destilovanou vodou až do vymiznutia voľného chlóru v odtekajúcom filtráte. Získaný preparát sme vysušili v prúde vzduchu na Büchnerovom lieviku.

Stanovenie aktívneho chlóru v chlóróvanom vaječnom albumíne

Aktívny chlór v chlóróvanom vaječnom albumíne sme stanovovali jodometricky titráciou jódu vylúčeného z roztoku KJ 0,1 N- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ takto:

Približne 50 mg vzorky sme rozpustili v 50 ml zmesi tlmivého roztoku KH_2PO_4 a NaOH o pH 7,0 a 2 % roztoku KJ. Po rozpustení vzorky sme zmes okyslili pridaním 1 ml konc. HCl a vylúčený jód sme titrovali 0,1 N- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Chlóróvaný vaječný albumín je vo vode nerozpustný, avšak v uvedenom tlmivom roztoku sa za intenzívneho miešania po niekoľkých minútach rozpúšťa.

Príprava roztokov chlóróvaného vaječného albumínu a ich riedenie

Rozpustením chlóróvaného vaječného albumínu v 100 ml tlmivého roztoku o pH 7,0 sme pripravili 3 % roztok, ktorý sme postupne vždy desaťkrát zriedili. Tak sme získali päť rôznych riedení roztoku. Po 5 ml z každého zriedeného roztoku sme pridávali do

10 ml živného Nielsenovho prostredia a do 10 ml sladiny. Výsledná koncentrácia skúmaného prípravku bola potom od 1 % do 0,0001 %, t. j. postupne desaťkrát nižšia. Pritom sme brali do úvahy obsah aktívneho chlóru, ktorý sa kontroloval.

Vplyv reagensů použitých pri mikrobiologickom teste na obsah aktívneho chlóru v chlórovanom vaječnom albumíne

Zníženie obsahu aktívneho chlóru v priebehu mikrobiologických pokusov (10 dní) sme sledovali:

- a) vo vode,
- b) v tlmivom roztoku KH_2PO_4 a NaOH o pH 7,
- c) v Nielsenovom roztoku (1000 ml destilovanej vody, 1 g KH_2PO_4 , 0,7 g MgSO_4 kryšt., 0,5 g NaCl, 0,4 g CaO, 0,6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 g sacharózy, 1,5 ml 1 % roztoku FeCl_3),
- d) v pivovarskej sladine o 8 % váh. extraktu, pH 5,2.

Koncentrácia chlórovaného vaječného albumínu vo vzorkách a, b a c, bola 0,1 % a vo vzorkách d bola 0,1 % a 1 %.

V prípade a sa chlórovaný vaječný albumín nerozpustil; v prípade b sa priamo rozpustil; v prípade c a d sme rozpúšťanie robili tak, že sme chlórovaný vaječný albumín najprv rozpustili v 5 ml tlmivého roztoku b a potom sme do roztoku pridali 10 ml Nielsenovho roztoku c alebo d.

1 % roztok chlórovaného vaječného albumínu, pripravený pridaním 150 mg tejto látky do 5 ml tlmivého roztoku b a 10 ml sladiny d, rozpúšťa sa nedokonale a jodometrické stanovenie aktívneho chlóru je potrebné robiť pozvoľna, po stálom dotitovaní vylučovaneého jódu. Vylučovanie jódu sa po jednej hodine za intenzívneho miešania zmesi ukončí.

Použitá mikroorganizmy

Na pokusy sa použili mikroorganizmy, izolované z cukrovej repy alebo z repnej šťavy počas jej spracovania v cukrovare:

a) kvasinky *Zygosaccharomyces thermotolerans*, izolované z difúznej repnej šťavy (M. Kutková, A. Kocková-Kratochvílová [2]),

b) *Fusarium sambucinum* 1510, izolované z cukrovej repy v kampani 1956 (A. Kocková-Kratochvílová, M. Kutková, M. Petrová [3]),

c) *Celvibrio species* L-27, izolované z pôdy repného poľa (A. Kocková-Kratochvílová [4]).

Vyhodnocovanie rastu mikroorganizmov

a) Rast kvasiniek sme hodnotili počítaním buniek v 1 ml prostredia v Bürkerovej komôrke.

b) Rast plesne sa posudzoval vážením sušiny jej mycélia tak, že sa kultivačná tekutina s narastenou hubou filtrovala cez vysušené a zvážené sklené kelímky G 3 a po dokonalom premytí vodou sa kelímky 3 hodiny sušili pri 105 °C a opäť sa vážili.

c) Rast baktérií sme hodnotili na Langeho kolorimetri tak, že sme kultúru najprv odstredili a znova suspendovali v 100 ml destilovanej vody. Kultúry dobre narastené sme ešte riedili vodou v pomere 1 : 2. Na meranie absorpcie svetla sme použili 100 ml kvety o hrúbke 35 mm. Vyhodnotenie sme urobili podľa percenta absorpcie svetla.

Zaočkovanie mikroorganizmov a inkubácia

Kultúry pre naočkovanie sme 3 dni vopred pripravili na sladínovom šikmom agare, preniesli do fyziologického roztoku a dobre roztrepali. Očkovali sme po 0,5 ml z týchto suspenzií. Inkubovali sme pri 28 °C. Vzorky na hodnotenie rastu sme odoberali v jednodňových intervaloch.

Vyhodnotenie pokusov

Výsledky experimentálneho stanovenia obsahu aktívneho chlóru ukázali, že v chlórovanom vaječnom albumíne bolo 8,45 % aktívneho chlóru. Prípravok mal charakteristický zápach jednak po chlórámínoch, jednak po voľnom chlóre. Voľný chlór sa však po rozpustení prípravku v tlmivom roztoku alebo po jeho pridaní do vody nevyskytoval. Prípravok sme uschovali v prachovnici pri 5 °C.

Obsah aktívneho chlóru počas pokusov uvedených v tejto zpráve po 5 mesiacoch poklesol z 8,45 na 6,08. Túto skutočnosť sme vždy uvážili, a preto pri každom použití vzorky sme opätovne stanovovali obsah aktívneho chlóru.

Výsledky pokusov zachycuje tab. 1 až 4.

Tabuľka 1

Ubúdanie obsahu aktívneho chlóru chlórovaného vaječného albumínu v rozpúšťadlách použitých pri mikrobiologických testoch ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Rozpúšťadlo	Množstvo rozpúšťadla (ml)	Množstvo tlmivého roztoku pridaného do rozpúšťadla (ml)	Koncentrácia skúmanej látky (%)	Pôvodné množstvo aktívneho chlóru v skúmanej látke (%)	Množstvo aktívneho chlóru po				
					4 hod.	20 hod.	72 hod.	120 hod.	240 hod.
a) H ₂ O	15	0	0,1	7,00	6,65	6,00	4,60	4,35	3,20
b) tlmivý roztok	15	0	0,1	7,00	3,50	1,22	0,48	0,20	0,04
c) Nielsenov roztok	10	5	0,1	7,00	3,58	1,28	0,54	0,20	0,02
d) pivovarská nezriedená sladinka	10	5	0,1	7,00	1,25	0,78	0,00	0,00	0,00
e) pivovarská nezriedená sladinka	10		1,0	7,00	3,18	1,83	1,10	0,30	0,03

Tab. 1 znázorňuje ubúdanie obsahu aktívneho chlóru chlórovaného vaječného albumínu v rozpúšťadlách použitých pri mikrobiologických testoch. ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.)

Tabuľka 2

Počet kvasiniek v miliónoch v 1 ml pivovarskej nezriedenej sladinky a Nielsenovho roztoku po pridaní chlórovaného vaječného albumínu

Množstvo skúmanej látky (%)	Počet kvasiniek po 3 dňoch		Počet kvasiniek po 5 dňoch		Počet kvasiniek po 7 dňoch		Počet kvasiniek po 10 dňoch	
	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok
Kontrolná skúška (bez skúmanej látky)	11,0	6,2	44,0	7,4	64,7	27,9	20,6	22,2
0,0001	38,2	5,6	36,2	6,6	42,0	11,2	39,0	10,0
0,001	18,7	2,3	38,5	4,7	35,7	9,7	40,8	29,2
0,01	4,2	2,3	48,5	1,2	33,7	11,1	46,5	37,2
0,1	5,2	3,7	26,2	1,4	64,0	9,7	76,7	27,7
1,0	2,3	0,0	4,4	0,0	12,2	0,0	18,2	0,0

Tab. 2 udáva počet kvasiniek v miliónoch v 1 ml pivovarskej nezriedenej sladinky a Nielsenovho roztoku po pridaní chlórovaného vaječného albumínu.

Overenie účinnosti prípravku

Pri vyšších koncentráciách, ktoré zabraňovali vývoju mikroorganizmov, sme sa pokúsili overiť, či zaočkované zárodoky boli zničené alebo len vo vývoji zastavené. Preto sme inhibovanú kultúru po 3 a 7 dňoch preočkovali do sviežo pripravenej pôdy bez inhibítora. Ukázalo sa, že mikroorganizmy z Nielsenovho roztoku sa v novom živnom prostredí o tom istom zložení ďalej nerozmnožujú, zatiaľ čo kultúry na sladine sú schopné vývoja. Tak sme rozhodli o mikrobiostatickom a mikrobicídnom účinku danej koncentrácie za daných podmienok.

Účinnosť prípravku sme sledovali aj mikroskopicky. Pritom sme posudzovali vzhľad mikróbných buniek. 1 % koncentrácia chlórovaného vaječného albumínu v Nielsenovom roztoku viedla zaočkované bunky po troch dňoch až k autolýze.

Diskusia

Účinok chlórovaného vaječného albumínu na mikroorganizmy závisí od obsahu aktívneho chlóru (pozri tab. 1 až 4). Výsledky v tab. 1 ukazujú, ako sa aktívny chlór stráca v rôznych použitých mikrobiologických prostrediach. K najväčšej strate aktívneho chlóru dochádza v sladine. Rýchla strata aktívneho chlóru je spôsobená jeho veľkou reaktivnosťou s organickými zlúčeninami v sladine. Preto sa inhibičný účinok prípravku za takýchto podmienok znižuje a mikroorganizmy lepšie rastú. Inhibičný účinok skúmaného prípravku je teda väčší v syntetickom Nielsenovom roztoku než v sladine. Naše

Tabuľka 3

Vizuálne a gravimetrické vyhodnotenie rastu *Fusarium sambucinum* 1510 v pivovarskej sladine a v Nielsenovom roztoku po pridaní chlórovaneého vaječného albumínu

Množstvo skúmanej látky (%)	Vizuálne vyhodnotenie rastu po 2 dňoch		Vizuálne vyhodnotenie rastu po 4 dňoch		mg sušiny mikroorganizmov po 7 dňoch		mg sušiny mikroorganizmov po 10 dňoch	
	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok
Kontrolná skúška (bez skúmanej látky)	koža na povrchu	koža na povrchu	koža na povrchu	koža na povrchu	18,7	9,2	30,2	13,0
0,0001	koža na povrchu	koža na povrchu	koža na povrchu	koža na povrchu	16,7	9,2	29,3	13,4
0,001	koža na povrchu	koža na povrchu bez kože	koža na povrchu	koža na povrchu	13,0		28,9	11,1
0,01	bez kože	bez kože	tenká koža na povrchu	tenká koža bez kože	16,3	3,2	27,3	9,8
0,1	bez kože	bez kože	bez kože	bez kože	12,8	pod hranicou citlivosti stanovenia	24,3	pod hranicou citlivosti stanovenia
1,0	bez kože	bez kože	bez kože	bez kože	pod hranicou citlivosti stanovenia	lýza	pod hranicou citlivosti stanovenia	lýza

Tab. 3 znázorňuje vizuálne a gravimetrické vyhodnotenie rastu *Fusarium sambucinum* 1510 v pivovarskej sladinke a v Nielsenovom roztoku po pridaní chlórovaneého vaječného albumínu.

Tabuľka 4

Kolorimetrické vyhodnotenie rastu *Celvibrio species L-27* v pivovarskej sladinke a v Nielsenovom roztoku po pridaní chlórovaného vaječného albumínu

Množstvo skúmanej látky (%)	Adsorpcia svetla po 3 dňoch		Adsorpcia svetla po 5 dňoch		Adsorpcia svetla po 7 dňoch		Adsorpcia svetla po 10 dňoch	
	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok	pivovarská sladinka	Nielsenov roztok
Kontrolná skúška (bez skúmanej látky)	24	10	32	15	20	10	—	—
0,0001	22	26	48	50	42	43	—	—
0,001	26	33	43	62	38	54	—	—
0,01	31	40	32	81	36	59	—	—
0,1	3	pod hranicou citlivosti stanovenia	17	pod hranicou citlivosti stanovenia	28	pod hranicou citlivosti stanovenia	—	pod hranicou citlivosti stanovenia
1,0	pod hranicou citlivosti stanovenia	lýza	pod hranicou citlivosti stanovenia	lýza	pod hranicou citlivosti stanovenia	lýza	pod hranicou citlivosti stanovenia	lýza

Tab. 4 uvádza kolorimetrické vyhodnotenie rastu *Celvibrio species L-27* v pivovarskej sladinke a v Nielsenovom roztoku po pridaní chlórovaného vaječného albumínu.

zistenie je v súhlase s pozorovaním iných autorov (H. C. Marks, F. B. Stradkov [5], G. A. Cox, H. R. Whitehead [6], M. K. Markaryan [7]), ktorí zistili, že baktericídny účinok kyseliny chlórnej a niektorých chlóraminov sa znižuje po pridaní dusíkatých látok do reakčného prostredia, napríklad roztoku bielkovín a ich štiepných produktov. Tieto dusíkaté zlúčeniny reagujú s aktívnym chlórrom, čo má za následok jeho ubúdanie v skúmanom prostredí.

Z našich pozorovaní vyplýva, že najmenší účinok skúmaného prípravku sa prejavil na kvasinke *Zygosaccharomyces thermotolerans*, izolovanej z difúznej šťavy. Na úplné zničenie kvasničných buniek bola potrebná 1 % koncentrácia prípravku v Nielsenovom roztoku. Pri použití sladiny došlo len k počiatočnému potlačeniu rozmnožovania.

Účinnosť chlórovaného vaječného albumínu na *Fusarium sambucinum* 1510 a na *Celvibrio species* L-27 bol približne rovnaký. V oboch prípadoch sa prejavil mikrobicídny účinok 1 % koncentrácie prípravku v Nielsenovom roztoku, takže počas 10 dňovej inkubácie nedošlo k rozmnožovaniu. Takýto účinok sa pri tejto najvyššej koncentrácii javil aj v sladine; v Nielsenovom roztoku nedošlo k rozmnožovaniu pri koncentrácii 0,1 %.

Možno povedať, že mikrobicídny účinok má chlórovaný albumín iba vo vysokých koncentráciách. Pri nižších koncentráciách ide len o mikrobiostatický účinok. Naproti tomu sa pozoroval aj stimulačný účinok chlórovaného vaječného albumínu, pôsobiaci ako výživná látka, najmä v Nielsenovom roztoku, len čo došlo k väčšiemu poklesnutiu obsahu aktívneho chlóru (tab. 2 a 4).

Pri porovnaní dosiahnutých výsledkov o účinnosti chlórovaného vaječného albumínu na mikroorganizmy s inými N-chlóraminmi možno povedať, že chlórovaný vaječný albumín má určitú nevýhodu oproti iným podobným látkam. Ide totiž o jeho nerozpustnosť vo vode a o pomerne rýchlu stratu aktívneho chlóru v roztoku. Jeho účinok je však značný, napríklad rast *Fusarium sambucinum* 1510 inhibuje v Nielsenovom roztoku aj pri koncentrácii 0,001 %.

Všetky proteíny obsahujú po chlorácii zrejme aktívny chlór, keďže majú dusík viazaný v polypeptidických reťazcoch. Preto pri chlorácii dochádza k substitúcii vodíka chlórrom, ako vysvetľuje už H. D. Dakin [8]: $-\text{CONH}-\text{H} \rightarrow -\text{CONCl}-$. Substitúciu vodíkov na dusíku chlórrom možno, pravda, očakávať i mimo aminoskupín viazaných polypeptidickými väzbami. Aj saturačná V—K krieda, vyrobená zo saturačného kalu, obsahuje aktívny chlór (J. Vašátko, L. Stankovič [9]), pretože východiskový materiál — saturačný kal — obsahuje takisto proteíny. Ukazuje sa výhodným použiť saturačnú V—K kriedu ako poprašok pri skladovaní cukrovej repy na zabránenie rozvoja mikrobiálnych procesov.

Aktívny chlór v suchej saturačnej V—K kriede, ako aj v suchom chlórva-

nom vaječnom albumíme je dostatočne stabilný (J. Vašátko, E. Stankovič [1, 9]), čo je veľká výhoda oproti chlórovanému vaječnému albumínu v rozpustenom stave, keď dochádza k rýchlej strate aktívneho chlóru. Preto sa v ďalších pokusoch budeme zaoberať podrobnejším výskumom látok s obsahom aktívneho chlóru pri použití vo forme popraškov.

Súhrn

Pripravili sme chlórovaný vaječný albumín s obsahom aktívneho chlóru. Porovnávali sme doterajšie naše výsledky zamerané na získanie maximálneho obsahu aktívneho chlóru v chlórovanom vaječnom albumíne. V práci opisujeme mikrobiocídny a mikrobiostatický účinok chlórovaného vaječného albumínu na kvasinky *Zygosaccharomyces thermotolerans*, izolované z difúznej cukrovarníckej šťavy, na *Fusarium sambucinum 1510*, izolované z cukrovej repy, a na *Celvibrio species L-27*, izolované z pôdy repného poľa.

Sledovali sme i ubúdanie aktívneho chlóru v živných pôdach, používaných pri pestovaní mikroorganizmov. Diskutujeme o dosiahnutých výsledkoch a sledujeme využitie látok s obsahom proteínov, ktoré pri chlórovaní viažu chlór v aktívnej forme.

ДЕЙСТВИЕ ХЛОРИРОВАННОГО ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Й. ВАШАТКО, Е. СТАНКОВИЧ

ЧСАН, Химический институт Словацкой академии наук в Братиславе

Мы приготовили хлорированный яичный альбумин, содержащий активный хлор. Мы также сравнивали наши предыдущие результаты, которые проводились с целью получения максимального содержания активного хлора в хлорированном яичном альбумине. В работе описывается микробицидное и микробиостатическое действие хлорированного яичного альбумина на *Zygosaccharomyces thermotolerans*, изолированного из диффузионного сахарного сока, на *Fusarium sambucinum 1510*, изолированного из сахарной свеклы и на *Celvibrio species L-27*, изолированного из глины свекловичного поля.

Мы также исследовали убыток активного хлора в культивационных средах, применяемых при культивации микроорганизмов. Мы обсуждаем полученные результаты и занимаемся вопросом использования веществ с содержанием протеинов, которые при хлорировании вяжут хлор в активной форме.

Поступило в редакцию 28. 7. 1960 г.

WIRKUNG VON CHLORIERTEM EIALBUMIN AUF MIKROORGANISMEN

J. VAŠÁTKO, E. STANKOVIČ

ČSAV, Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften in Bratislava

Die Autoren stellten chloriertes Eialbumin mit einem Gehalt an aktivem Chlor her. Sie verglichen ihre bisherigen Ergebnisse, welche auf die Gewinnung eines maximalen

Gehalts an aktivem Chlor im chlorierten Eialbumin ausgerichtet waren. In der vorliegenden Arbeit wird die mikrobiocide und mikrostatistische Wirkung chlorierten Eialbumins auf *Zygosaccharomyces thermotolerans* beschrieben, welches aus dem Diffusionsaft der Zuckerfabrikation, ferner auf *Fusarium sambucinum* 1510, welches aus der Zuckerrübe, und *Celvibrio species L-27*, welches aus dem Boden des Rübenfelds isoliert wurde.

Es wurde auch die Abnahme an aktivem Chlor in Nährböden, die beim Züchten von Mikroorganismen benutzt werden, untersucht. Die erzielten Ergebnisse werden diskutiert und die Nutzbarmachung von Stoffen mit einem Gehalt an Proteinen, welche beim Chlorieren das Chlor in aktiver Form zu binden vermögen, untersucht.

In die Redaktion eingelangt den 28. 7. 1960

LITERATÚRA

1. Vašátko J., Stankovič L., Chem. zvesti 13, 817 (1959). — 2. Kutková M., Kocková-Kratochvílová A. (v tlači). — 3. Kocková-Kratochvílová A., Kutková M., Petrová M., Česká mykologie 12, 83 (1958). — 4. Kocková-Kratochvílová A., Sborník vysokej školy pedagogickej, Bratislava 1958. — 5. Marks H. C., Strandskov F. B., USP 2 552 490. — 6. Cox G. A., Whitehead H. R., J. Dairy Research 16, 327 (1949). — 7. Markaryan M. K., Gigiena i sanit. No. 4, 12 (1952). — 8. Dakin H. D., Brit. Med. J. 2, 218, 809 (1915). — 9. Vašátko J., Stankovič L., Chem. zvesti 13, 592 (1959).

Do redakcie došlo 28. 7. 1960

Adresa autorov:

*Akademik Jozef Vašátko, Bratislava, Kollárovo nám. 2, Chemický pavilón SVŠT.
Prom. chemik Ludovít Stankovič, Bratislava, Mlynské nivy 37, Chemický ústav SAV*