

BARBARA OWCZARCZYK, JERZY MAZURCZAK

Badania nad zastosowaniem nowego antymetabolitu kwasu foliowego w profilaktyce zakażeń bakteryjnych.

Cz. II. Mechanizm działania nowego antymetabolitu kwasu foliowego

Z Instytutu Zoohigieny i Profilaktyki w Produkcji Zwierzęcej Wydziału Zootechnicznego SGGW-AR w Warszawie

W wyniku szeregu badań nad mechanizmem działania antymetabolitów kwasu foliowego (AKF) okazało się, że szereg 2,4-dwuaminopiryimidyn *in vitro* hamuje wzrost niektórych mikroorganizmów (11). Mechanizm działania AKF polega na wiązaniu grup 2-aminowych z enzymem katalizującym redukcję kwasu dwuhydrofoliowego (DHF) do czterohydrofoliowego (THF), to jest z reduktazą kwasu dwuhydrofoliowego (E.C.1.5.1.3.) (6, 33).

Biologiczna aktywność FA wiąże się z jego zredukowaną formą — THF. Reakcja redukcji katalizowana jest przez dwa układy enzymatyczne.

1. $DHF + NAD(P)H + H^+ \rightarrow THF + NAD(P)^+$
2. $FA + 2NAD(P)H + 2H^+ \rightarrow THF + 2NAD(P)^+$

W warunkach fizjologicznych reakcja redukcji FA przebiega ze znacznie mniejszą prędkością niż redukcja DHF. Zakrzewski i Nichol (34) wykazali, że obie te reakcje mogą być katalizowane przez ten sam enzym.

Badania nad zawartością enzymu w komórkach bakteryjnych w fazie niesynchronizowanego wzrostu wskazują, że jego specyficzna aktywność różni się znacznie podczas wzrostu kultury i maksimum osiąga na początku fazy logarytmicznej (23), aby po jej zakończeniu powrócić do normalnie niskiego poziomu.

Badając rozmieszczenie enzymu w wątrobie szczura Brown (4) wykazał, że większa część występuje we frakcji cytoplazmatyczno-mikrosomalnej. Aktywność tego enzymu jest wyższa u zarodków niż osobników dorosłych (27), a w tkankach nowotworowych wyższa niż w normalnych komórkach (28).

Wykazano, że istnieje ścisła korelacja pomiędzy inhibicją aktywności reduktazy DHF a wzrostem drobnoustrojów (17). Na ogół antymetabolity FA, które powodują silniejszą inhibicję aktywności tego enzymu, w większym stopniu hamują wzrost bakterii (17). Dodanie do podłoża THF lub jego pochodnych powoduje, że nie obserwuje się hamującego wpływu 2,4-dwuaminopiryimidynowych pochodnych antymetabolitów FA na wzrost kultur bakterijnych. Wynika stąd, że związki te mogą blokować również inne układy enzymatyczne, w których koenzymami są pochodne THF (16). Najbardziej

jednak wrażliwym enzymem jest reduktaza kwasu dwuhydrofoliowego.

Aby wykazać filogenetyczną selektywność w wiązaniu antymetabolitów FA przez reduktazę DHF przeprowadzono szereg badań nad enzymami izolowanymi z organizmów jedno i wielokomórkowych (6, 12, 15, 22, 29). Dla enzymów pochodzących z komórek bakteryjnych i zwierzęcych nie stwierdzono zasadniczych różnic w optimum pH, wartościach K_m dla DHF i innych zwykle mierzonych parametrów (7, 8). Występują natomiast istotne różnice w sile wiązania poszczególnych antymetabolitów FA przez enzymy izolowane z komórek różnych organizmów (6, 17). I tak stężenie TMP konieczne do zahamowania w 50% aktywności reduktazy DHF pochodzenia zwierzęcego jest około 16 tysięcy razy większe niż dla enzymu bakteryjnego (17). Natomiast dwuhydrotriazyna wykazuje 200-krotnie mniejsze powinowactwo do enzymu bakteryjnego niż zwierzęcego.

Chociaż takie czynniki jak transport, pula metabolitów w komórce i inne parametry mogą mieć wpływ na aktywność AKF, podstawą ich działania jest jednak siła wiązania z enzymem. Zablockowanie reakcji redukcji DHF zmniejsza komórkową pulę koenzymów zawierających THF lub jego pochodne i tym samym prowadzi do śmierci komórki, określanej jako tak zwana „śmierć tyminowa” (9, 10, 13, 31). Dlatego związki, które wykazują większe powinowactwo do reduktazy DHF w większym stopniu zmniejszają populację żywych komórek (18).

Dzięki intensywnym badaniom otrzymano szereg związków, które hamując aktywność reduktazy DHF w komórce bakteryjnej nie wpływały jednocześnie na analogiczne układy warunkujące przemianę FA w komórce zwierzęcej. Wymienić tu należy przede wszystkim pirymetaminę i wcześniej już wspomniany TMP.

Zgodnie z opiniami wyrażonymi w szeregu pracach przyjęto założenie, że praktyczne zastosowanie mogą mieć tylko te AKF, które wykazują selektywne właściwości idące w dwu zasadniczych kierunkach:

a) oddziałują na poszczególne etapy biogenezy FA, hamując aktywność jednego lub więcej enzymów pośredniczących w tej biogenezie,

b) specyfika oddziaływania na wybraną reakcję enzymatyczną jest zmienna w układzie filogenetycznym i silniejsza dla niższych form rozwojowych świata zwierzęcego (1, 17, 19, 20, 35).

W podejmowaniu badań nad mechanizmem nowego związku przyjęto twierdzenie, że biogeneza FA jest wieloetapowa i charakterystyczna dla każdego ustroju (34). Z tego też względu mogą istnieć różnego rodzaju AKF działające na poszczególne etapy tej biogenezy. W poprzedniej pracy zwrócono uwagę, że HPN może działać w odmiennym mechanizmie niż TMP (24). Celem obecnie relacjonowanych badań jest próba bliższego wyjaśnienia etapu biogenezy FA, na którym może inhibować ten proces badany przez nas związek.

Materiał i metody

Badania prowadzono na modelowym dla tych doświadczeń szczepie *E. coli* według metodyki uprzednio opisanej (5, 24). Do doświadczeń używano podłoża M-9 (21), do którego dodawano różne stężenia kwasu d,l-glutaminowego (d,l-GA) i kwasu l-glutaminowego (l-GA). Do tak zmodyfikowanych podłoży dodawano HPN. Postępowanie kontrolne polegało na dodawaniu do identycznych podłoży TMP. W kolejnych doświadczeniach stosowano stężenie bakteriostatyczne obu związków określone w poprzednich badaniach (24). Z tego względu HPN stosowano stale w stężeniu 200 mcg/ml, a TMP — 1,0 mcg/ml. Dodatek kwasu glutaminowego do podłoża dla obu związków był zawsze taki sam i wynosił w poszczególnych doświadczeniach 7,5, 15,0 i 30,0 mcg/ml. Te same ilości stosowano dla obu racemicznych form kwasu glutaminowego.

W dalszej części badań obserwowano wzrost drobnoustrojów zarówno w fazie logarytmicznej wzrostu jak i w fazie stacjonarnej. Liczbę żywych komórek bakteryjnych w 1 ml podłoża określano w odstępach godzinnych przez 7 godzin oraz po 24 godzinach.

Wyniki

Wyniki kolejnych doświadczeń, będące średnimi z trzech powtórzeń, przedstawiają ryc. 1—4.

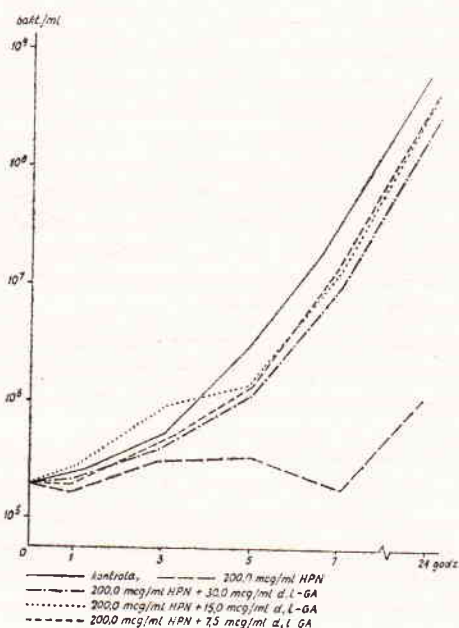
Porównując zachowanie się krzywych na ryc. 1 i 2 stwierdza się różną intensywność wzrostu modelowego szczepu *E. coli* dla obu badanych związków. Pod wpływem kwasu d,l-glutaminowego dodawanego do podłoża M-9, niezależnie od jego stężenia, efekt bakteriostatyczny HPN występujący przy stosowanym stężeniu 200 mcg/ml zostaje zniesiony i wzrost bakterii jest analogiczny do kontroli (ryc. 1). To samo doświadczenie z zastosowaniem TMP (ryc. 2) wykazało brak wpływu kwasu glutaminowego na efekt bakteriostatyczny TMP w stężeniu 1,0 mcg/ml, które to stężenie było uprzednio ustalone (24). Wynik ten potwierdza się również w tych doświadczeniach, kiedy TMP stosowano do podłoża z dodatkiem kwasu l-glutaminowego (ryc. 4). W przypadku dodania formy l kwasu glutaminowego do podłoża wraz z HPN nie uzyskano tak wyraźnego zniesienia bakteriostatycznej aktywności HPN jak przy formie d,l (ryc. 3). W porównaniu do analogicznych efektów uzyskiwanych z zastosowaniem TMP (ryc. 4) należy stwierdzić również w tym przypadku odmienny efekt działania HPN.

Omówienie wyników

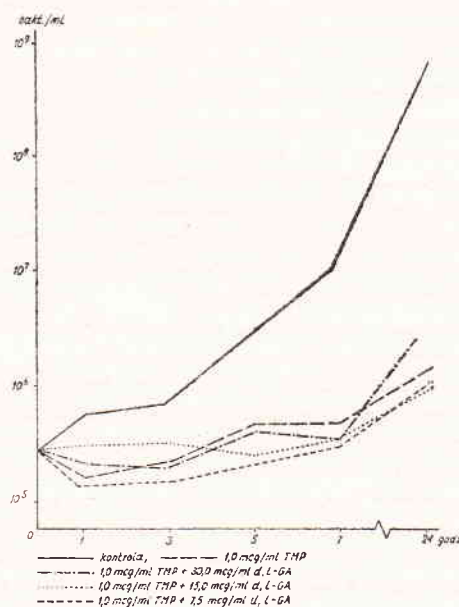
Z wcześniej opisanych badań można było wnioskować, że „miejsce działania” HPN znajduje się w początkowych etapach biosyntezy

FA. Sugestię tę oparto na wynikach odmiennej reakcji HPN i TMP wówczas, kiedy do podłoża M-9 dodawano aminokwasy, nukleozydy i FA (24).

Badania nad mechanizmem działania HPN rozpoczęto od poszukiwania prawdopodobnych punktów działania tego związku w biogenezie FA, które byłoby odpowiedzialne za hamowanie wzrostu testowego szczepu *E. coli*, stale używanego w naszych badaniach. W doświadczeniach własnych zastosowano sposób postępowania, który określono jako „odwracanie efektu HPN”.



Ryc. 1. Wpływ dodawania do podłoża M-9 kwasu d,l-glutaminowego na wzrost *E. coli* w obecności HPN



Ryc. 2. Wpływ dodawania do podłoża M-9 kwasu d,l-glutaminowego na wzrost *E. coli* 743 w obecności TMP

Zasada opiera się na dodawaniu do podłoża M-9 wybranego „wyznacznika” z ciągu metabolicznego FA wraz z HPN z założeniem, że nastąpi wówczas zmiana intensywności wzrostu testowanego mikroorganizmu.

Przyjęte postępowanie może stanowić jedynie pośrednie wytłumaczenie mechanizmu działania badanego związku. Bezpośrednie określenie tego mechanizmu będzie możliwe na drodze badania aktywności poszczególnych enzymów i stopnia inhibicji pod wpływem HPN. Mimo tego zastrzeżenia można twierdzić, że mechanizm działania HPN jest odmienny niż znanych dotychczas antymetabolitów takich jak TMP. Prawdopodobnie działanie HPN umiejscowione jest na znacznie wcześniejszym etapie biogenezy FA niż ma to miejsce przy działaniu TMP. Wniosek taki można dyskutować w świetle danych z piśmiennictwa.

Z badań Browna (3, 4) i Shiota (30) wynika, że ekstrakty komórkowe *E. coli* lub *Lactobacillus arabinosus* zawierają system enzymów odpowiedzialny za syntezę związków, które wykazują aktywność kwasu foliowego dla wzrostu *Streptococcus faecalis*. Bezpośrednim prekursorem pterydynowym najprawdopodobniej jest 2-amino-4-hydrokso-6-hydroksymetylodwuhydropterydyna, która w wyniku reakcji z p-AB tworzy kwas pteroinowy, a z kwasem p-ABG kwas dwuhydrofoliowy. Dla *E. coli* biogeneza DHF przebiega w myśl reakcji:

1. 2-amino-4-hydrokso-6-hydroksymetylodwuhydropterydyna + ATP + p-AB → kwas dwuhydropteroinowy

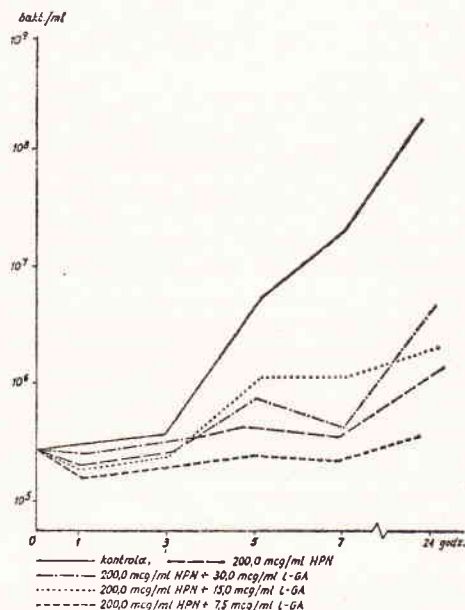
2. Kwas dwuhydropteroinowy + kwas glutaminowy → kwas dwuhydrofoliowy

W reakcji katalizowanej przez oczyszczony enzym ani kwas pteroinowy ani czterohydropteroinowy nie może zastąpić dwuhydropteroinowego. Ponadto kwas γ -l-glutamyl- γ -l-glutaminowy oraz γ -l-glutamyl- γ -l-glutamyl- γ -l-glutaminowy nie może zastąpić kwasu glutaminowego.

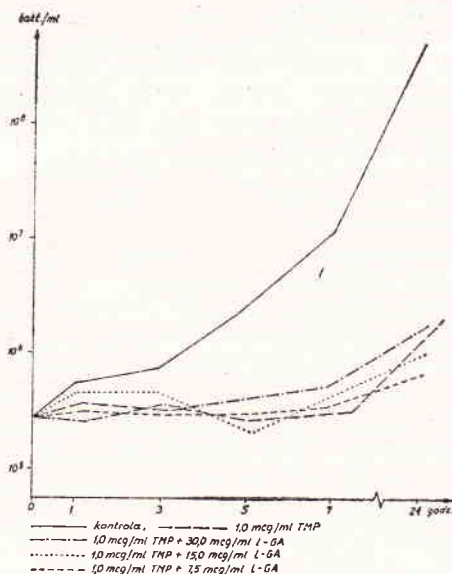
Dla ekstraktów *E. coli* wykazano również istnienie systemu katalizującego syntezę kwasu γ -l-czterohydrofolyloglutaminowego z kwasu l-GA, THF i ATP (14, 26, 32). Kwas FA lub DHF nie może zastąpić THF w tej reakcji. Wydaje się więc, że u *E. coli* kolejnymi produktami katalizowanych reakcji są kwas dwuhydropteroinowy, DHF, THF, kwas γ -l-THF-glutaminowy i kwas γ -THF- γ -glutamylglutaminowy. Wiadomo jednakże, że ekstrakty z *E. coli* w badaniach *in vitro* mogą wykorzystywać p-ABG jednakże z dużo mniejszą efektywnością niż p-AB (2).

Opierając się na przedstawionych wiadomościach i wynikach własnych badań wydaje się, że HPN działa w innym miejscu niż znane antymetabolity FA i prawdopodobnie wpływa na reakcje związane z biosyntezą lub przemianą kwasu glutaminowego. Za takim stwierdzeniem przemawiają uzyskane wyniki przedstawione na ryc. 1—4.

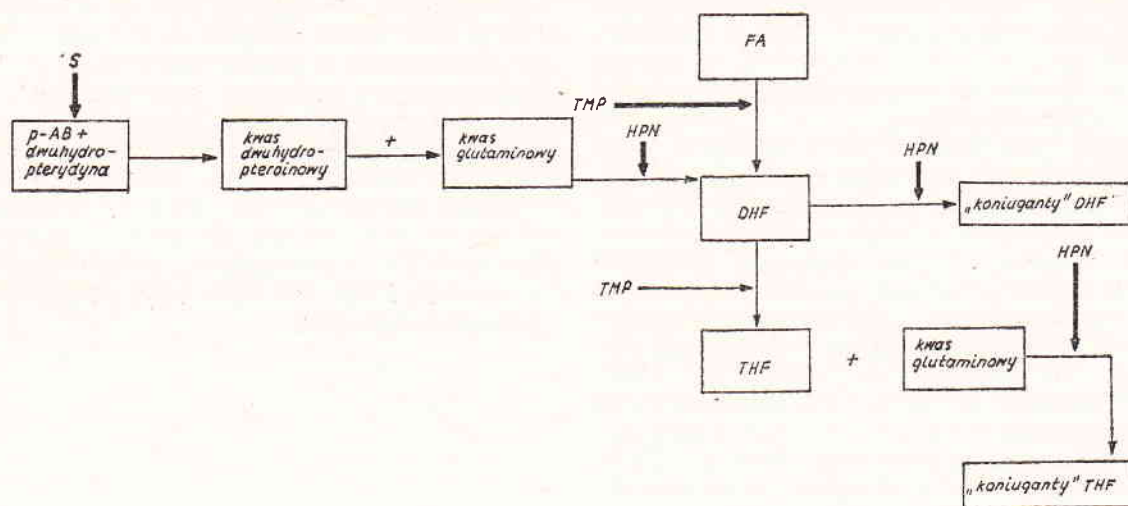
Okazuje się, że istotną rolę w odwracaniu reakcji hamowania wzrostu *E. coli* spowodowanej dodaniem do podłoża HPN odgrywa kwas glutaminowy, a zwłaszcza jego forma d.l. Wynika stąd, że HPN może hamować włączanie kwasu glutaminowego do cząsteczki kwasu pteroinowego lub upośledza kondensację THF z kwasem glutaminowym. Wiadomo bowiem, że naturalnie występujące koenzymy będące pochodnymi THF są związkami, których cząsteczka zawiera kilka, na ogół trzy, reszty kwasu glutaminowego (25).



Ryc. 3. Wpływ dodawania do podłoża M-9 kwasu l-glutaminowego na wzrost *E. coli* 743 w obecności HPN



Ryc. 4. Wpływ dodawania do podłoża M-9 kwasu l-glutaminowego na wzrost *E. coli* 743 w obecności TMP



Ryc. 5. Prawdopodobne miejsce działania HPN w torze przemianowym FA w porównaniu do SM i TMP (S-sulfonamid)

Można zatem przyjąć hipotezę umiejscawiającą działanie HPN w biogenezie FA (ryc. 5). Przedstawiane badania upoważniają do przyjęcia twierdzenia, że działanie HPN obejmuje te etapy biochemicznych przemian, w które zaangażowane są pochodne kwasu foliowego. Na korzyść takiego stwierdzenia przemawia wpływ FA na wzrost drobnoustrojów pod wpływem HPN (24). Możliwe, że HPN jest inhibitorem systemu enzymatycznego odpowiedzialnego za tworzenie „koniugatów” poliglutaminianowych.

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że większość badań enzymatycznych dotyczyła monoglutaminianów, natomiast mechanizm tworzenia t.zw. „koniugatów” glutaminianowych jest nadal w pełni nie wyjaśniony. Jest także prawdopodobne, że działanie HPN może prowadzić do wyczerpania puli kwasu glutaminowego na jednym z etapów jego biosyntezy czy przemian. Dotyczy to zwłaszcza reakcji katalizowanej przez formylotransferazę lub forminotransferazę, których koenzymem jest THF, a jednym z produktów kwas glutaminowy.

Interesująca wydaje się również niejednakowa efektywność izomerów kwasu glutaminowego, której wyjaśnienia nie obejmuje jednak założony cel pracy. Pełne wyjaśnienie mechanizmu działania HPN wymaga jeszcze szczegółowych badań. Stwierdzony jednak inny mechanizm działania HPN stwarza realne możliwości zastosowania tego związku jako dodatkowego czynnika potencjującego działanie innych antymetabolitów FA. Tym samym mogą powstać perspektywy praktycznego zastosowania HPN w leczeniu do zapobiegania zakażeniom bakteryjnym.

Piśmiennictwo

1. Blakley R. L.: The biological reduction pteridines. In „Biochemistry of folic acid and related pteridines”, North-Holland, 139, 1969.

2. Brown G. M., Weissman R. A., Molnar D. A.: J. Biol. Chem., 236, 2534, 1961.
3. Brown G. M.: J. Biol. Chem. 237, 536, 1962.
4. Brown S. S., Neal G. E., Williams D. C.: Biochem. J. 97, 34c, 1965.
5. Burchall M.: Mikrobiologia żywności, PWRiL, 1971.
6. Burchall J. J., Hitchings G. H.: Mol. Pharmacol., 1, 126, 1965.
7. Burchall J. J.: Postgrad. Med. J. (Suppl. 45), 29, 1969.
8. Burchall J. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 186, 142, 1971.
9. Cohen S. S., Barner H. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 40, 885, 1954.
10. Cohen S. S.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 186, 292, 1971.
11. Dantel L. J., Norris L. C.: Growth inhibition of bacteria by synthetic pterines, 170, 747, 1947.
12. Eyles D. E., Coleman N.: Antibiotics Chemotherapy, 3, 483, 1953.
13. Greenberg D. M., Nath R., Humphreys G. K.: J. Biol. Chem. 236, 2271, 1961.
14. Griffin M. J., Brown G. M.: J. Biol. Chem. 239, 310, 1964.
15. Hitchings G. H., Falco E. A., Vanderwerff H., Russel P. B., Elion G. B.: J. Biol. Chem. 199, 43, 1952.
16. Hitchings G. H., Elion G. B., Singer S.: Chemistry and biology of pteridines, London: Churchill, 1954.
17. Hitchings G. H., Burchall J. J.: Adv. in Enzymology, 27, 417, 1965.
18. Hitchings G. H., Burchall J. J., Ferone R.: Symp. Soc. Gen. Microbiol. 294, 1966.
19. Hitchings G. H., Burchall J. J., Ferone J.: Proc. 3th Intern. Pharm. Meeting, Sao Paolo, 5, 3, 1966.
20. Jukes T. H., Broquist H. P.: Metabolic Inhibitors, Academic Press, New York, 1963.
21. Landy M., Dicken D. M., Falls M. A. Ch.: J. Lab. Clin. Med., 27, 1086, 1942.
22. Lux R. E.: Antibiotics Chemother. 4, 971, 1954.
23. Nixon P. F., Blakeley R. L.: J. Biol. Chem. 243, 4722, 1968.
24. Owczarczyk B., Mazurczak J.: Med. Wet., 1977 (w druku).
25. Rabinowitz J. C., Himes R. H.: Federation Proc. 19, 963, 1960.
26. Reynolds J. J., Brown G. M.: J. Biol. Chem. 239, 317, 1964.
27. Roberts D., Hall T. C.: Cancer Res., 25, 1894, 1965.
28. Roberts D., Wocklinsky I., Hall T. C.: Cancer Res., 25, 1899, 1965.
29. Roth B., Falco E. A., Hitchings G. H.: J. Med. Pharm. Chem. 5, 1103, 1962.
30. Shtota T.: Arch. Biochem. Biophys. 80, 155, 1953.
31. Wahda A. J., Friedkin M.: J. Biol. Chem. 237, 3794, 1962.
32. Weissman R. A., Brown G. H.: J. Biol. Chem. 239, 326, 1964.
33. Wood R. C., Ferone R., Hitchings G. H.: Biochem. Pharmacol. 6, 113, 1961.
34. Zakrzewski F. S., Nichol Ch. A.: J. Biol. Chem. 235, 2984, 1960.
35. Zakrzewski F. S.: J. Biol. Chem. 235, 1780, 1960.

Adres autora: Barbara Owczarczyk, ul. Akermajska 1 m 15, Warszawa.

Овчарчик Б., Мазурчак Е. — Исследования по применению нового антиметаболита фолиевой кислоты в профилактике бактериальных инфекций. II. Механизм действия нового антиметаболита фолиевой кислоты.

В исследованиях механизма действия HPN использовали метод, состоящий в „обращении эффекта HPN” в культуре М-9 рацемическими формами глутаминовой кислоты. Для сравнения использовали аналогичные схемы опытов с TMP на модельном

штамме *E. coli*. Полученные результаты уполномочивают утверждать, что механизм HPN отличается от TMP. Действие HPN располагается на значительно более раннем этапе биогенеза FA чем при действии TMP и связано с количеством d,l-глутаминовой кислоты в клетке. Можно принять гипотезу, что HPN является ингибитором системы, ответственной за образование полиглутаминатных „конъюгатов”, зависящих от количества глутаминовой кислоты. Полное выяснение механизма действия HPN требует дальнейших подробных исследований.

Owczarczyk B., Mazurczak J. — **Studies on the application of a new folic acid antimetabolite in prophylaxy of bacterial infections. II. Mechanism of action a new antimetabolite of folic acid.**

In the studies on the mechanism of HPN action a new procedure based on a „reversion of MPN effect” in M-9 medium by racemic form of glutamic acid was introduced. In control studies analogic models of the experiments with the use of TMP and *Escherichia coli* as a reference strain were used. On the strength of the studies it was concluded that the mechanism of HPN and TMP actions are quite different. HPN acts on an earlier step of FA biogenesis than TMP. Its action is associated with a cell pull of d,l glutamic acid. A hypothesis is probable that HPN acts as an inhibitor of a system producing polyglutamate „conjugates” depended upon a pull of glutamic acid. Full elucidation of the mechanism of HPN action needs further studies.

TADEUSZ MAJEWSKI, LEON SABA

Badania mikroklimatyczne w fermie bydła opasowego typu „Fermbet”

Z Instytutu Żywności i Higieny Zwierząt AR w Lublinie

Istotnym czynnikiem środowiskowym, wywierającym wpływ, zwłaszcza w chowie alkie-rzowym, na zdrowotność i produktywność zwierząt są pomieszczenia inwentarskie. Zachodzi zatem bezpośrednia konieczność stałej ich oceny pod względem zoohigienicznym.

Dotyczy to zarówno starych budynków inwentarskich, jak i nowo wznoszonych obiektów (1, 3, 4, 5, 6, 7).

Z wielu typów obiektów inwentarskich aktualnie realizowanych spotkać można projekty wykonane przez „Bisprol”, przeznaczone dla tuczu młodego bydła opasowego, określane często mianem systemu „Fermbet”. Jest on rozpowszechniony w Polsce, lecz według powszechnych opinii jego użytkownikowi posiada pewne mankamenty techniczne, jak i technologiczne.

Uznano zatem za celowe podjęcie badań nad oceną mikroklimatu w dwóch budynkach fermy cieląt, wykonanej w oparciu o wspomniany system, z uwzględnieniem niektórych aspektów stanu zdrowotnego i produktywności zwierząt.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w fermie opasów zlokalizowanej w miejscowości K. w woj. zamojskim. Ferma została wykonana w 1975 r. i składa się z czterech obiektów tj. budynku przejściowego na 320 stanowisk, służącego do kompletowania zwierząt, budynku kwarantanny o 400 stanowiskach, w którym cielęta przebywają 28 dni i dwu budynków opasu po 380 stanowisk każdy, w których czas opasu wynosi 84 dni.

Ferma wykonana jest wg systemu „Fermbet” w oparciu o dokumentację typową WB-4413/73/1.

Budynek kwarantanny jest obiektem bezściółkowym o podłodze szczelinowej z elementów żelbetowych oraz o czterorzędowym układzie kojców z dwoma korytarzami paszowymi. Obiekt posiada wymiary 54 ×

× 12,6 m, wykonany jest bezsłupowo i podzielony na halę zwierząt i pomieszczenie pomocnicze. Zwierzęta trzymane są w boksach po 20 szt. Kanały gnojowicowe znajdują się pod całą powierzchnią kojców, zbierane odchody są przekazywane za pośrednictwem kolektora do zbiornika przepompowni, a następnie do zbiorników magazynujących.

Budynek opasu ma wymiary 48 × 12,6 m, składa się z hali zwierząt oraz pomieszczeń pomocniczych. Przez środek obiektu biegnie korytarz paszowy, po obu stronach którego znajdują się boksy po 6 szt. z każdej strony.

Wspomniane pomieszczenia są jednokondygnacyjne, bez poddasza użytkowego. Ściany podłużne obydwu budynków wykonane są z żelbetu izolowanego wewnątrz płytami ze styropianu, ściany szczytowe natomiast wykonane są z cegły kratówki na zaprawie cementowo-wapiennej. Belki podokienne i słupy nośne w obu obiektach wykonane są z żelbetu, nieocieplone. Budynki wyposażone są w wentylację mechaniczną, składającą się z czterech wentylatorów o mocy 0,25 Kw umieszczonych w kalenicy, które są sterowane termometrem kontaktowym, ustawionym na temp. +15°C. W obiektach istnieją ponadto dwa wentylatory wyciągowe usuwające powietrze z kolektora gnojowicowego.

Badania mikroklimatyczne wykonano w dwóch obiektach tzn. w budynku kwarantanny oraz jednym z pomieszczeń opasu. Pomiarów mikroklimatycznych przeprowadzono w okresie od września do lutego, wykonując je regularnie w odstępach dwutygodniowych, w cyklach dobowych z częstotliwością pomiarów co 3 godz.

Temperaturę i wilgotność powietrza mierzono psychrometrem Assmanna. Ochładzanie katatermometrem Hilla. Prędkość ruchu powietrza oznaczano przy pomocy katatermometrów „srebrzonych”. Stężenie CO₂ określano przez adsorbcję tego gazu na stałym NaOH. Amoniak oznaczono metodą kolorymetryczną, wykorzystując zdolność wiązania NH₃ przez roztwór H₂SO₄ i jego reakcję z odczynnikami Nesslera.

Uzyskane wyniki z pomiarów podzielono na dwa okresy, biorąc za podstawę temperatury zewnętrzne powietrza.

Okres I — charakteryzował się dodatnimi temperaturami zewnętrznymi i obejmował lato oraz jesień.