

---

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Biliński  
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej. Instytut Patologii Klinicznej. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. Zygmunt Hencner

Teresa WACH, Zygmunt HENCNER

**Azot całkowity, azot  $\alpha$ -aminowy,  $pH$  w przesączach hodowli różnych serotypów leptospir na płynnym podłożu Korthofa**

Тотальный азот,  $\alpha$ -аминовый азот,  $pH$  в фильтратах выращивания разных серотипов пелтоспир в жидкой среде Кортхофа

Total Nitrogen,  $\alpha$ -Amine Nitrogen and  $pH$  in the Cultural Filtrates of Various Leptospiral Serotypes being Cultured in a Liquid Korthof's Medium

Najczęściej do namnażania leptospir stosuje się podłoże Korthofa. Procesy biochemiczne zachodzące w nim podczas inkubacji leptospir nie są dokładnie poznane. Nasze obserwacje miały na celu wyjaśnić, jak kształtuje się w tym podłożu stężenie azotu całkowitego, azotu  $\alpha$ -aminowego, wartość  $pH$  w zależności od wieku i temperatury prowadzonych hodowli.

MATERIAŁ I METODY

Badano podłoże Korthofa i podłoże zakażone leptospirami w różnych okresach hodowli. Obserwacje prowadzono na 3 serotypach: *Leptospira patoc*, *Leptospira canicola* i *Leptospira icterohaemorrhagiae* (szcep 20 i szcep Wijnberg). Temperatura inkubacji wynosiła: a) 30°C, b) 26°C. Próby do analizy odlewano sterylnie. Sączono przez sączki Schotta G-5. Przesącz zagęszczano w eksykatorze próżniowym, a następnie poddawano analizie chemicznej.

Azot całkowity oznaczano metodą mikro-Kjeldahla w aparacie Parnasa (do analizy pobierano 5 ml przesączu z hodowli i zagęszczano do objętości 1 ml).

Azot  $\alpha$ -aminowy oznaczano według metody Pope-Stewensa, oddzielając kompleks miedziowy od roztworu przez wirowanie. Do analizy pobierano 2 ml przesączu hodowli, odparowywano w eksykatorze próżniowym do objętości 1 ml. Do tej ilości dodawano 2 ml ortofosforanu miedziowego, zostawiano na 20 min. w temperaturze pokojowej. Część rozpuszczalną oddzielano od osadu przez wirowanie.

wanie. Z roztworu nad osadem pobierano 2 ml płynu do erlenmeyerki, zakwaszono kwasem octowym lodowatym, dodawano 2 g jodku potasu. Miareczkowano 0,01 M roztworem  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Przyjęto, że 1 ml 0,01 M roztworu tiosiarczanu sodowego, zużytego podczas miareczkowania, odpowiada 0,28 mg azotu  $\alpha$ -aminowego. W wyliczeniach końcowych w przypadku azotu całkowitego i  $\alpha$ -aminowego uwzględniono rozcieńczenia. Podane w tabelach wyniki stanowią średnie arytmetyczne ( $\bar{X}$ ) z 9—11 pomiarów równoległych hodowli. Ustalono przedział ufności, uwzględniając średni błąd kwadryczny średniej arytmetycznej i wartość funkcji Studenta przy odpowiedniej liczbie stopni swobody dla prawdopodobieństwa 95% (8).

Wolny amoniak wykrywano jakościowo przy pomocy odczynnika Nesslera.

Pomiary  $\text{pH}$  prowadzono przy pomocy pehametru LBS-66.

Komórki leptospirowe w poszczególnych okresach hodowli liczono w komorze Petroffa-Hansena.

#### WYNIKI BADAŃ

1. Stwierdzono, że w miarę starzenia się hodowli, prowadzonych zarówno w temp. 30, jak i 26°C, stężenie azotu całkowitego w przesączach bezkomórkowych stopniowo malało (tab. 1).

2. Stężenie azotu  $\alpha$ -aminowego ulegało zmianom nieregularnym. Po upływie jednej doby w przesączach z hodowli badanych serotypów, inkubowanych w temp. 30°C obserwowano ubytek azotu  $\alpha$ -aminowego. W następnych okresach poziom azotu  $\alpha$ -aminowego kształtował się różnie, w pewnym stopniu w zależności od wieku hodowli, a także serotypu. Obserwowano zarówno ubytek, jak i przyrost stężenia (tab. 2). Największy ubytek azotu  $\alpha$ -aminowego stwierdzono: w przesączach z hodowli *L. canicola* w siódmej dobie, z hodowli *L. icterohaemorrhagiae*-20 — w czwartej dobie, z hodowli *L. icterohaemorrhagiae* W i j n b e r g i *L. patoc* w pierwszej dobie. W tym okresie u serotypów *L. canicola* i *L. icterohaemorrhagiae* obserwowano pewną współzależność pomiędzy ubytkiem azotu  $\alpha$ -aminowego w przesączach a ilością komórek leptospirowych w hodowlach.

3. W przesączach hodowli prowadzonych w temp. 26°C ubytek azotu  $\alpha$ -aminowego był niewielki (tab. 2). Po upływie jednej doby inkubacji, zmniejszenie stężenia azotu  $\alpha$ -aminowego obserwowano głównie u *Leptospira icterohaemorrhagiae* W i j n b e r g. W przesączach hodowli *L. patoc* niewielki ubytek stwierdzono dopiero w ósmej dobie.

4. Wolny amoniak stwierdzono jakościowo w przesączach hodowli prowadzonych w temp. 30°C w siódmej dobie. Natomiast w przesączach hodowli inkubowanych w temp. 26°C w większości przypadków w trzeciej dobie.

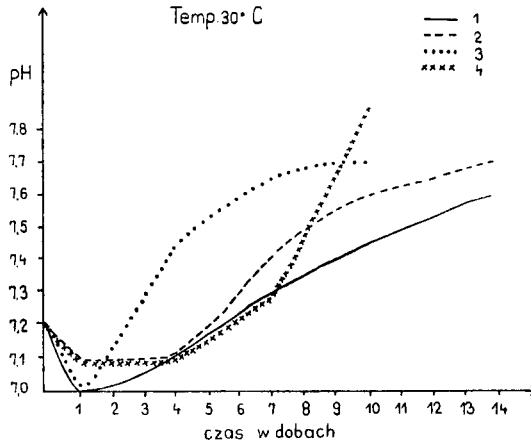
5. Bezpośrednio po zakażeniu leptospirami  $\text{pH}$  badanych hodowli wynosiło 7,2. W pierwszej dobie inkubacji prowadzonej w temp. 30°C obser-

Tab. 1. Azot całkowity w płynnym podłożu Korthofa podczas hodowli różnych serotypów leptospir, wyrażony w mg/ml Total nitrogen in a liquid Korthof's medium during the culturing of various leptospiral serotypes (mg/ml of the clear filtrate)

Podłoże Korthofa	Temperatura inkubacji	Czas hodowli	<i>Leptospira canicola</i>	<i>Leptospira patoc</i>	<i>Leptospira ictero. 20</i>	<i>Leptospira ictero. Wijnberg</i>
1,52 $\pm$ 0,03	30°C	0	1,52 $\pm$ 0,030	1,52 $\pm$ 0,030	1,52 $\pm$ 0,030	1,52 $\pm$ 0,030
		jedna doba	1,35 $\pm$ 0,025	1,36 $\pm$ 0,018	1,38 $\pm$ 0,013	1,34 $\pm$ 0,020
		czwarta doba	1,30 $\pm$ 0,018	1,36 $\pm$ 0,022	1,26 $\pm$ 0,005	1,34 $\pm$ 0,054
		siódma doba	1,17 $\pm$ 0,040	1,36 $\pm$ 0,035	1,26 $\pm$ 0,030	1,31 $\pm$ 0,065
	26°C	dziesiąta doba	1,17 $\pm$ 0,029	1,23 $\pm$ 0,040	1,50 $\pm$ 0,030	1,25 $\pm$ 0,030
		czternasta doba	1,12 $\pm$ 0,030	1,22 $\pm$ 0,250	1,20 $\pm$ 0,050	1,25 $\pm$ 0,030
		0	1,46 $\pm$ 0,023	1,46 $\pm$ 0,230	1,46 $\pm$ 0,023	1,46 $\pm$ 0,023
		jedna doba	1,40 $\pm$ 0,015	1,46 $\pm$ 0,015	1,32 $\pm$ 0,018	1,35 $\pm$ 0,018
26°C	trzecia doba	1,37 $\pm$ 0,150	1,38 $\pm$ 0,018	1,37 $\pm$ 0,020	1,30 $\pm$ 0,050	
	szósta doba	1,29 $\pm$ 0,020	1,44 $\pm$ 0,020	1,34 $\pm$ 0,022	1,29 $\pm$ 0,030	
	ósmą doba	1,22 $\pm$ 0,035	1,32 $\pm$ 0,050	1,20 $\pm$ 0,035	1,29 $\pm$ 0,035	
	dziesiąta doba	1,22 $\pm$ 0,029	1,32 $\pm$ 0,035	1,21 $\pm$ 0,060	1,25 $\pm$ 0,025	

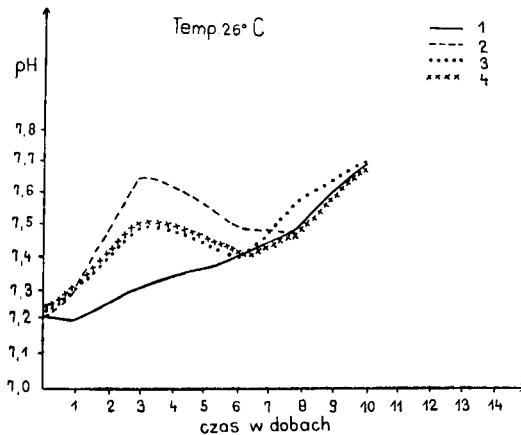
Tab. 2. Azot  $\alpha$ -aminowy w płynnym podłożu Korthofa podczas hodowli różnych serotypów leptospir, wyrażony w mg/ml  $\alpha$ -amine nitrogen in a liquid Korthof's medium during the culturing of various leptospiral serotypes, expressed in mg/ml of the nucellar filtrate

Podłoże jałowe Korthofa	Temperatura inkubacji	Czas inkubacji	<i>Leptospira canicola</i>	<i>Leptospira ictero. 20</i>	<i>Leptospira ictero. Wijnberg</i>	<i>Leptospira patoc</i>
0,410 $\mp$ 0,0036	30°C	0	0,410 $\mp$ 0,0036	0,410 $\mp$ 0,0036	0,410 $\mp$ 0,0036	0,410 $\mp$ 0,0030
		jedna doba	0,335 $\mp$ 0,0036	0,332 $\mp$ 0,0049	0,303 $\mp$ 0,0030	0,310 $\mp$ 0,0030
		czwarta doba	0,312 $\mp$ 0,0040	0,230 $\mp$ 0,0042	0,329 $\mp$ 0,0018	0,328 $\mp$ 0,0030
		siódma doba	0,192 $\mp$ 0,0040	0,398 $\mp$ 0,0025	0,302 $\mp$ 0,0045	0,323 $\mp$ 0,0070
	26°C	dziesiąta doba	0,338 $\mp$ 0,0028	0,371 $\mp$ 0,0050	0,391 $\mp$ 0,0029	0,391 $\mp$ 0,0020
		czternasta doba	0,320 $\mp$ 0,0045	0,437 $\mp$ 0,0034	0,391 $\mp$ 0,0029	0,403 $\mp$ 0,0050
		0	0,391 $\mp$ 0,0029	0,391 $\mp$ 0,0029	0,298 $\mp$ 0,0050	0,418 $\mp$ 0,0040
		jedna doba	0,361 $\mp$ 0,0040	0,366 $\mp$ 0,0034	0,342 $\mp$ 0,0035	0,434 $\mp$ 0,0030
26°C	trzecia doba	0,401 $\mp$ 0,0050	0,340 $\mp$ 0,0050	0,342 $\mp$ 0,0028	0,365 $\mp$ 0,0040	
	szósta doba	0,360 $\mp$ 0,0040	0,314 $\mp$ 0,0046	0,349 $\mp$ 0,0040	0,365 $\mp$ 0,0040	
	ósmą doba	0,305 $\mp$ 0,0028	0,321 $\mp$ 0,0040	0,349 $\mp$ 0,0040	0,365 $\mp$ 0,0040	
	dziesiąta doba	0,398 $\mp$ 0,0045	0,395 $\mp$ 0,0034	0,395 $\mp$ 0,0034	0,401 $\mp$ 0,0050	



Ryc. 1. Zmiany pH w przesączach hodowli różnych serotypów leptospir; 1 — *Leptospira canicola*, 2 — *Leptospira icterohaemorrhagiae* szczep 20, 3 — szczep Wijnberg, 4 — *Leptospira patoc*, inkubowanych na płynnym podłożu Korthofa w zależności od wieku hodowli

pH alternations dependent on the age of cultures in the cultural filtrates of various serotypes of leptospirae; 1 — *L. canicola*, 2 — *L. icterohaemorrhagiae* strain 20, 3 — Wijnberg, 4 — *L. patoc*, being incubated in a liquid Korthof's medium



Ryc. 2. Zmiany pH w przesączach hodowli różnych serotypów leptospir; 1 — *Leptospira canicola*, 2 — *Leptospira icterohaemorrhagiae* szczep 20, 3 — szczep Wijnberg, inkubowanych na płynnym podłożu Korthofa, w zależności od wieku hodowli

pH alterations dependent on the age of cultures kept in the cultural filtrates of various serotypes of leptospirae; 1 — *Leptospira canicola*, 2 — *Leptospira icterohaemorrhagiae* strain 20, 3 — Wijnberg, being incubated in a liquid Korthof's medium

wowano nieznaczne przesunięcie wartości  $pH$  w kierunku kwaśnym. Między drugim a czwartym dniem hodowli stwierdzono stopniową alkalizację (ryc. 1). W hodowlach inkubowanych w temp.  $26^{\circ}C$  alkalizacja zachodziła wcześniej. Natomiast przesunięcie wartości  $pH$  w kierunku kwaśnym stwierdzono dopiero w szóstej dobie (ryc. 2). W czternastym dniu hodowli  $pH$  osiągnęło wartość 7,8 (w przesączach  $pH$  kształtowało się analogicznie jak w całych hodowlach).

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

1. W przesączach hodowli wszystkich badanych serotypów leptospir  $pH$  kształtowało się podobnie. Na występujące różnice wpływały nie tyle właściwości serotypowe, ile warunki prowadzonych doświadczeń. Alkalizacja hodowli i ich przesączy zachodziła wolno, nie przekraczając w czternastym dniu wartości  $pH=8$ . W hodowlach prowadzonych w temp.  $26^{\circ}C$  alkalizacja przebiegała szybciej niż w hodowlach inkubowanych w temp.  $30^{\circ}C$ , gdzie częściej wykrywano wolny amoniak. Natomiast przesunięcie wartości  $pH$  w kierunku kwaśnym obserwowano znacznie później, około szóstej doby hodowli. Stalheim i Wilson (10) w czasie hodowli *Leptospira canicola* stwierdzili przesunięcie wartości  $pH$  w kierunku alkalicznym o 0,2—0,9 jednostek. Wyniki te w większości przypadków pokrywały się z uzyskanymi w naszych doświadczeniach, dotyczących różnych serotypów. Czas prowadzonych przez nas obserwacji był jednak dłuższy. Czekałowski i Rodikan (1) po upływie tygodnia uzyskali  $pH$  hodowli 7,5—7,8. Podczas naszych obserwacji alkalizacja hodowli zachodziła wolniej.

2. Nasuwa się pytanie, w jaki sposób powstaje amoniak w hodowlach leptospirowych. Czy na skutek działania dezaminaz, czy też jakiegoś innego czynnika? Dlaczego wolnego amoniaku nie stwierdzono we wszystkich okresach hodowli? Możliwe, że brak go w podłożu związany jest z większym okresowym nań zapotrzebowaniem. Przypuszczenia opieramy na sprostżeńiach autorów, którzy uznają amoniak za główne źródło azotu dla leptospir (3, 4, 5, 9).

3. Ubytek azotu całkowitego z przesączy wzrastał w miarę starzenia się hodowli. Podobne zjawisko stwierdził Klimek (6) w czasie doświadczeń z laseczką tężca. Autor ten uważa, że przyczyną ubytku azotu całkowitego są dezaminazy wydzielane endogennie przez laseczki tężca. Obecność zaś dezaminaz uzasadniał wydzielaniem się gazowego amoniaku. Kondratiewa i Schwiedowa (7), obserwując hodowle niektórych beztlenowców z rodzaju *Clostridium*, stwierdziły zmniejszanie się

azotu całkowitego na ubogim w białko podłożu. W podłożu bogatym w białko wzrost związany był z silną proteolizą i przyrostem azotu całkowitego. W odniesieniu do leptospir nie przeprowadzano tego rodzaju badań.

4. Ubytek azotu  $\alpha$ -aminowego w hodowlach poszczególnych serotypów leptospir kształtował się różnie. W większości przypadków, zwłaszcza w początkowym okresie hodowli, ubytek azotu  $\alpha$ -aminowego mieścił się w ubytku azotu całkowitego. W nielicznych przypadkach stwierdzono ubytek azotu  $\alpha$ -aminowego przy nienaruszonym stężeniu azotu całkowitego. W pewnych okresach stężenie azotu  $\alpha$ -aminowego w przesączach wzrastało. Iwanowa i Siergiejewa (2), obserwując hodowle *Clostridium botulinum*, stwierdziły u najbardziej proteolitycznych szczepów trzykrotny przyrost azotu  $\alpha$ -aminowego. W przypadku leptospir należy przypuszczać, że inne czynniki odpowiedzialne są za przyrost azotu  $\alpha$ -aminowego. Nasze obserwacje wykazały, że podczas hodowli leptospir zachodzą w podłożu Korthofa procesy sugerujące działanie enzymatyczne. Ubytek azotu całkowitego, w pewnych okresach azotu  $\alpha$ -aminowego, stopniowa alkalizacja, śladowe ilości wolnego amoniaku wskazywałyby na występowanie dezaminaz. Prawdziwy obraz maskuje w pewnym stopniu, obok ubytku, przyrost stężenia azotu  $\alpha$ -aminowego.

5. Obniżenie temperatury hodowli o kilka stopni wpływało ujemnie na przebieg badanych procesów. Wcześniejsza alkalizacja sugeruje mniejsze zapotrzebowanie na amoniak.

6. W ogólnym zarysie ubytek azotu całkowitego w hodowlach wszystkich badanych serotypów leptospir przebiegał podobnie. Natomiast stężenie azotu  $\alpha$ -aminowego kształtowało się w poszczególnych okresach hodowli odmiennie u różnych serotypów. Obserwowano pewien wpływ temperatury inkubacji na zawartość azotu  $\alpha$ -aminowego.

7. Różnice zachodzące pomiędzy serotypami nie były większe od różnic występujących pomiędzy szczepami tego samego serotypu (*Leptospira icterohaemorrhagiae*-20 oraz W i j n b e r g).

#### PIŚMIENNICTWO

1. Czekalowski I., W. McLeod I. W., Rodican J.: J. General Microbiol. **10**, 199—204, 1954.
2. Iwanowa L. G., Siergiejewa N.: Żurn. Mikrobiol. Epid. Immunol. **1**, 101—107, 1964.
3. Johnson R. C., Gary N. D.: J. Bacteriol. **83**, 668—672, 1962.
4. Johnson R. C., Rogers P.: Arch. of Biochem. Biophys. **107**, 459—470, 1964.
5. Johnson R. C., Virginia G., Harris, Judith K. Walby: J. General Microbiol. **55**, 309—407, 1969.
6. Klimek J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sectio D **20**, 35—41, 1965.
7. Kondratiewa W. F., Schwiedowa W. H.: Mikrobiologija **32**, 929—935, 1963.

8. Minczewski J., Marczenko Z.: *Chemia analityczna*, PWN, Warszawa 1965, s. 49 (Statystyczne kryteria oceny wyników).
9. Shenberg E.: *J. of Bacteriol.* **93**, 1598—1606, 1967.
10. Stalheim O. H. V., Wilson J. B.: *J. Bacteriol.* **88**, 48—54, 1964.

Otrzymano 23 XI 1976.

#### РЕЗЮМЕ

В фильтрах выращивания пелтоспир в жидкой среде Кортхофа определено, что у всех исследованных серотипов концентрация тотального азота постепенно понижалась пропорционально времени культивирования. Концентрация  $\alpha$ -аминового азота изменялась нерегулярно в зависимости от срока выращивания, температуры и серотипа. Одновременно наблюдали как прирост так и израсходование концентрации  $\alpha$ -аминового азота. Постепенным образом определено алкализацию фильтратов, зависящих от срока и температуры выращивания.

#### SUMMARY

Total nitrogen concentration gradually decreased in the cultural filtrates of all the examined leptospiral serotypes: the process being directly proportional with the time of incubation.  $\alpha$ -amine nitrogen concentration changed unregularly which was dependent upon the time of culturing, temperature and serotype. The concentration mentioned above both increased and decreased. Gradual alkalization was shown to occur which was dependent upon the age and temperature of the cultures.

