

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Janusz KLIMEK

**Badania nad przemianą aminokwasową płynnej dziesięciodniowej hodowli laseczki tężca (*Clostridium tetani*). II. Oznaczanie azotu całkowitego, alfa-aminowego oraz pH podłoży i przesączy hodowli**

**Исследования аминокислотного обмена жидкой десятидневной культуры палочки столбняка (*Clostridium tetani*). II Обозначение полного и альфа-аминового азота, pH субстрата и фильтратов культуры**

**The Investigation of the Amino Acid Transformation of the Liquid 10-Day-Old Culture of *Clostridium tetani*. II. Determination of the Total and  $\alpha$ -Amino Nitrogen and of the pH of Media and Filtrates of the Culture**

Zagadnienie, czy *Cl. tetani* zalicza się do szczepów proteolitycznych czy sacharolitycznych, jest do tej pory przedmiotem dyskusji. Pierwsze stanowisko reprezentowane jest przez tych badaczy, którzy uważają, że do hodowli laseczki tężca używać należy podłoży bogatych w białkowe substancje, z których następnie drogą enzymatycznej hydrolizy powstają aminokwasy potrzebne do syntezy: komórki i toksyny (3, 4, 5 i 7). Mniejszą grupę zwolenników zyskał pogląd zakładający, że czynności życiowe i toksynotwórcze tężca są uwarunkowane przez węglowodanowe substraty (1 i 8). Badania nasze mają wyjaśnić, czy tężcowe komórki wydzielają, czy też nie, proteolityczne enzymy. Odpowiedzi na postawione pytania dostarczą porównawcze oznaczenia zawartości aminowego i całkowitego azotu w podłożach oraz przesączach otrzymanych wg opisu podanego w I cz. (2).

#### METODA BADAŃ I MATERIAŁY

Do badań użyto 14 podłoży i 11 przesączy dostarczonych przez Lubelską Wytwórnię Surowic i Szczepionek oraz 15 przesączy otrzymanych z własnych hodowli (2). Oznaczenia azotu całkowitego podłoży i przesączy przeprowadzono metodą mikro-Kjeldahla w aparacie Parnasa. Azot alfa-aminowy oznaczono wg metody

Pope-Stevensa, stosując do oddzielenia miedziowego kompleksu od roztworu, wirówkę (Laborfug — Węgry) na 2 000 obrotów/min. Do pomiarów pH podłoży i przesączy używano pH-metru Sp. Pracy Piezoeletrotechnika — Polska. Wszystkie odczynniki stosowane w pracy pochodziły z Hurtowni Chemicznej w Gliwicach.

#### BADANIA WŁASNE

#### 1. Oznaczenie azotu całkowitego podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*.

1 ml próbki spalono w kolbie Kjeldahla w obecności 98%  $H_2SO_4$  i  $CuSO_4$  przez 6 godzin nad elektryczną maszynką. Klarowny roztwór przenoszono do aparatu Parnasa, alkalizowano 40% NaOH, po czym przepuszczano parę wodną przez 30 min. Wydzielający się  $NH_3$  absorbowano w 0,1 N HCl. Nadmiar nie związanego przez amoniak kwasu, miareczkowano 0,1 N NaOH wobec czerwieni obojętnej. Następnie drogą rachunkową obliczano zawartość całkowitego azotu.

Tab. 1. Zawartość azotu całkowitego w mg/ml w podłożach Legroux-Ramon oraz w przesączach dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*  
The content of total nitrogen in mg/ml in Legroux-Ramon media and in the filtrates of the ten-day-old culture of *Clostridium tetani*

L. p.	Seria	Ilość azotu całkowitego w mg/ml	
		Podłoża	Przesączy
1	93	2,60	2,55
2	94	2,21	2,17
3	100	2,07	2,05
4	101	2,60	2,50
5	102	2,35	2,31
6	104	2,24	2,20
7	105	2,30	2,27
8	108	2,45	2,35
9	109	2,57	2,49
10	110	2,17	2,10
11	112	2,11	2,06
12	I	2,33	2,31
13	II	2,43	2,37
14	III	2,27	2,20
Średnia $\bar{x}$		2,35	2,28
Błąd standardowy średniej arytmetycznej $\sigma_{\bar{x}}$		0,046	0,043
Przedział ufności $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}} t_{0,05}$		$2,35 \pm 0,099$	$2,28 \pm 0,093$

W tab. 1, kolumna 2 umieszczono numery serii (cyfry arabskie odnoszą się do podłóż i przesączy z masowej hodowli, prowadzonej przez Lubelską Wytwórnę Surowic i Szczepionek, cyfry rzymskie odpowiadają podłożom i przesączom własnych hodowli). W dolnej części tabeli podano wyliczone wartości: średniej arytmetycznej, błędu standardowego średniej arytmetycznej oraz przedziału ufności dla teoretycznej wartości średniej, przy założeniu, że w 95 przypadkach na 100 wyniki oznaczeń będą mieściły się w obliczonym przedziale.

Tab. 2. Zawartość azotu  $\alpha$ -aminowego w mg/ml w podłożach Legroux-Ramon oraz w przesączach dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*  
The content of  $\alpha$ -amino nitrogen in mg/ml in Legroux-Ramon media and in the filtrates of the ten-day-old culture of *Clostridium tetani*

L. p.	Seria	Ilość azotu alfa-aminowego w mg/ml	
		Podłoża	Przesącza
1	93	0,532	0,618
2	94	0,501	0,593
3	100	0,494	0,577
4	101	0,493	0,566
5	102	0,479	0,564
6	104	0,520	0,590
7	105	0,509	0,574
8	108	0,524	0,617
9	109	0,532	0,632
10	110	0,506	0,566
11	112	0,524	0,622
12	I	0,550	0,648
13	II	0,541	0,650
14	III	0,537	0,630
Średnia $\bar{x}$		0,518	0,610
Błąd standardowy średniej arytmetycznej $\sigma_{\bar{x}}$		0,005	0,010
Przedział ufności $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}} t_{0,05}$		0,518 $\pm$ 0,0108	0,610 $\pm$ 0,0216

## 2. Oznaczanie azotu alfa-aminowego podłóż Legroux-Ramon oraz przesączy dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*.

Do próbki wirówkowej na 10 ml wprowadzono 1 ml analizy oraz 3 ml zawiesiny ortofosforanu miedziowego. Po piętnastu minutach odzielano część rozpuszczalną od osadu w wirówce przy 2 tys. obrotów/min.

Z otrzymanego przesączu pobierano 3 ml, zakwaszono 2 ml kwasu octowego (lod.) i dodawano 0,2 g KJ. Przyjmując, że 1 ml 0,01 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  zużytego do miareczkowania odpowiada 0,28 mg azotu alfa-aminowego, obliczono jego zawartość w próbkach. Otrzymane wyniki przedstawia tab. 2 (układ tej tabeli odpowiada tab. 1).

Tab. 3. pH podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*

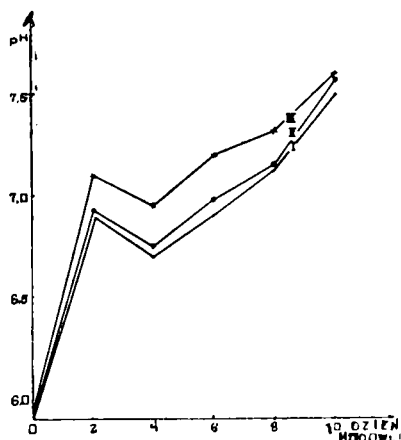
The pH of Legroux-Ramon media and of the filtrates of the ten-day-old culture of *Clostridium tetani*

L. p.	Seria	pH	
		Podłoża	Przesącza
1	93	6,00	7,45
2	94	5,80	8,02
3	100	6,10	7,80
4	101	5,70	7,32
5	102	5,95	7,80
6	104	5,80	7,75
7	105	6,15	7,30
8	108	5,90	7,50
9	109	5,80	7,70
10	110	6,00	7,60
11	112	6,10	7,80
12	I	5,90	7,50
13	II	5,90	7,40
14	III	5,92	7,60
Średnia $\bar{x}$		5,93	7,61
Błąd standardowy średniej arytm. $\sigma_{\bar{x}}$		0,04	0,051
Przedział ufności $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}} t_{0,05}$		$5,93 \pm 0,086$	$7,61 \pm 0,110$

### 3. Oznaczanie pH podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy dziesięciodniowych hodowli *Cl. tetani*.

Pomiary pH przeprowadzono na pożywkach Legroux-Ramon oraz przesączach z masowych hodowli *Cl. tetani*. Wyniki oznaczeń wraz ze statystycznymi obliczeniami przedstawia tab. 3.

Przy pomocy wykresu (ryc. 1) zobrazowano zmiany pH zachodzące w podłożach dla trzech niezależnych serii (I, II i III), w różnych okresach dziesięciodniowych kontrolnych posiewów laseczki tężca (2).



Ryc. 1. Wykres zmian pH podłoża Legroux-Ramon w czasie dziesięciodniowej hodowli laseczki tężca

Diagram of pH changes of Legroux-Ramon media in the ten-day-old culture of *Clostridium tetani*

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Przeprowadzone badania na azot całkowity dają wartości dla podłoży niezakażonych  $2,35 \pm 0,099$  mg N/ml; dla przesączy z hodowli tężca  $2,28 \pm 0,093$  mg N/ml. Uzyskane wyniki wskazują, że ilość azotu całkowitego w czasie trwania hodowli ulega zmniejszeniu. Zmniejszenie ilości azotu całkowitego w przesączach w porównaniu z podłożem wynosi zgodnie z obliczeniami  $0,056 \pm 0,010$  mg N/ml. Za zmniejszenie ilości azotu całkowitego odpowiedzialne są prawdopodobnie dezaminazy wytwarzane endogennie przez laseczki tężca, których obecność może uzasadnić wydzielanie gazowego amoniaku. Potwierdzeniem tego faktu było wykrycie przy pomocy próby Nesslera amoniaku we wszystkich badanych przesączach. Pomiar pH przeprowadzone równolegle w pewnym stopniu uzupełniają to przypuszczenie, ponieważ w każdym przypadku przesącz, w stosunku do podłoża, jest bardziej alkaliczny.

Uzyskane wyniki na azot całkowity nie pokrywają się z badaniami Surjana (7), która uważa, że ilość azotu całkowitego w czasie trwania hodowli nie ulega zmianie; wg tej autorki w podłożu winno być 2,2—2,6 mg N/ml. W naszej pracy wartość obliczona w podłożach Legroux-Ramon równa jest  $2,35 \pm 0,099$  mg/ml, a więc mieści się w podanym przedziale i odpowiada przyjętym standardom.

Przy oznaczaniu azotu alfa-aminowego wg metody Pope — Stevensa wprowadzono modyfikację w stosunku do oryginalnej metody oraz pewnych udoskonaleń innych autorów Blauth — Opieńska i wsp. (6).

Zawiesinę ortofosforanu miedzi odwirowywano, co pozwalało na łatwe odpipetowanie roztworu, ponieważ osad dobrze przylegał do ścianek probówki. Przy posługiwaniu się pipetkami wykalibrowanymi błąd pomiaru znacznie się zmniejsza. Metoda oryginalna, stosująca lejek z filtrem bibułowym jest niedokładna, ponieważ część analizowanego substratu pozostaje zaabsorbowana na sączku. Wprowadzona modyfikacja eliminuje całkowicie tę trudność, co obok prostoty wykonania i znacznego skrócenia toku wykonywanych czynności świadczy o celowości zastosowanego usprawnienia.

Z oznaczeń oraz przeprowadzonych statystycznych zestawień wynika, że następuje wzrost zawartości azotu alfa-aminowego w przesączach hodowli laseczki tężca w stosunku do podłoży jałowych. Wzrost ten wynosi  $0,085 \pm 0,0086$  mg N alfa-aminowego/ml. Odpowiedzialne są za to prawdopodobnie enzymy proteolityczne, które wywołują rozkład białka podłoża, na aminokwasy. Poziom azotu alfa-aminowego podłoży określono na  $0,518 \pm 0,0108$  mg N alfa-aminowego/ml, a przesączy na  $0,610 \pm 0,0216$  mg N alfa-aminowego/ml. Na podstawie prostych przeliczeń można ustalić, że ilość azotu alfa-aminowego stanowi 25% azotu całkowitego. Wynik ten jest mniejszy od podanego przez Surjan (7), która na swoich podłożach trawionych pepsyną, trypsyną i erypsyną uzyskuje stosunek azotu alfa-aminowego do całkowitego dochodzący do 50%.

Wyniki pomiarów pH wskazują na alkalizację podłoża w czasie hodowli laseczki tężca (ryc. 1). Jednym z argumentów potwierdzających to zjawisko jest wydzielany przez dezaminazy amoniak. Pomiar pH przeprowadzone przez Świtalską (8) na próbkach płynnej hodowli laseczki tężca wskazują, tak jak i w niniejszej pracy, na alkalizację przesączy. Bezwzględne wartości pH są rozbieżne (inne podłoże) i tak u Świtalskiej pH podłoży równe jest 7,1—7,4, a przesączy dziesięciodniowych hodowli 7,8—8,2. W naszej pracy przy użyciu pożywek Legroux-Ramon wartości były niższe i wynosiły dla podłoży  $5,93 \pm 0,086$ , a dla przesączy  $7,61 \pm 0,110$ . Obserwowano nieznaczne zakwaszenie podłoża między drugim i czwartym dniem hodowli. Ryc. 1 wyraźnie ilustruje ten fakt. Pomiaru wykonane przez Świtalską wskazują również na ciągłą alkalizację.

---

#### PIŚMIENNICTWO

1. J11jutowicz A., Torban M. A.: *Ż. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol.* **32**, 105—110, 1961.
2. Klimek J.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sec. D.* **20**, 29—34, 1965.
3. Malgras J., Mayer J., Sartory R., Veschambre R.: *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **84**, 635—640, 1953.

4. Miller P. A., Gray C. T., Eaton M. D.: J. Bact. 79, 95—102, 1960.
5. Mueller H. J., Miller P. A.: J. Biol. Chem. 223, 185—194, 1956.
6. Opieńska - Blauth J., Prasał Z.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, 14, 117—126, 1956.
7. Surjan M.: Z. allgem. Pathol. und Bacteriol. 19, 455—460, 1956.
8. Świtalska A.: Med. Dośw. Mikrobiol. 14, 35—50, 1962.

Pracę otrzymano 25 II 1965.

---

## РЕЗЮМЕ

В результате проведенных исследований установлено, что во время выращивания палочки столбняка клетками выделяются протеолитические энзимы, на существование которых указывает увеличенное количество альфа-аминоазота.

О присутствии дезаминаз свидетельствует уменьшение содержания общего азота, наличие несвязанного аммиака, а также алкализация фильтрата по отношению к субстрату.

Табл. 1. Количество общего азота в мг/мл в субстратах Legroux-Ramon и в фильтратах десятидневной культуры палочки столбняка (*Cl. tetani*).

Табл. 2. Количество альфа-аминоазота в мг/мл в субстратах Legroux-Ramon и в фильтратах десятидневной культуры палочки столбняка (*Cl. tetani*).

Табл. 3. pH субстратов Legroux-Ramon и фильтратов десятидневной культуры палочки столбняка (*Cl. tetani*).

Рис. 1. График изменений pH субстрата Legroux-Ramon во время десятидневного выращивания палочки столбняка.

---

## SUMMARY

It was found that during the growing of *Clostridium tetani* proteolytic enzymes were secreted, the existence of which was confirmed by an increased content of  $\alpha$ -amino nitrogen.

The presence of desaminases resulted in a decreased content of total nitrogen, occurrence of free ammonia and the alkalization of the filtrates in relation to the medium.

