

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Billński

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej. Instytut Patologii Klinicznej. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. Zygmunt Hencner

Teresa WACH, Zygmunt HENCNER

### Wolne aminokwasy w płynnym podłożu Korthofa w czasie hodowli różnych serotypów leptospir

Свободные аминокислоты в жидкой среде Кортхофа во время выращивания разных серотипов лептоспир

Free Aminoacids in a Liquid Korthof's Medium during the Culturing of Various Serotypes of Leptospirae

Opierając się na dotychczasowych danych literaturowych należy wnioskować, że aminokwasy nie są konieczne potrzebne do wzrostu leptospir. Prowadząc szereg niezależnych od siebie i w różnym czasie doświadczeń, większość autorów uzyskała zgodne wyniki dotyczące jedynie stymulującego działania asparaginy (8, 12, 13, 20, 26, 27, 29). Odnośnie innych aminokwasów spostrzeżenia były różne, często kontrowersyjne. W dużej mierze zjawisko to związane jest z trudną hodowlą leptospir na podłożach sztucznych, pozbawionych surowicy królika (1, 9, 14, 16, 26). Obecność zaś surowicy stanowi poważną przeszkodę w badaniach nad metabolizmem, wymaganiami odżywczymi, czynnikami wzrostowymi. Rozbieżność wyników i pewne luki w dotychczasowych obserwacjach skłoniły nas do zapoczątkowania serii doświadczeń dotyczących wolnych aminokwasów w płynnym podłożu Korthofa w czasie hodowli leptospir. Postawiono pytanie, czy wolne aminokwasy są pobierane z tego podłoża. Jeżeli tak, to jak kształtuje się zapotrzebowanie na nie przez rozwijające się populacje leptospir. Czy istnieją jakieś istotne różnice pomiędzy serotypami, na których podstawie udałoby się stworzyć diagram taksonomiczny.

#### MATERIAŁ I METODYKA

Badania przeprowadzono na przesączach z hodowli trzech serotypów leptospir: *Leptospira patoc*, *Leptospira canicola* i *Leptospira icterohaemorrhagiae*. W obrębie

serotypu *L. icterohaemorrhagiae* badano dwa szczepy: Wijnberg i *L. ictero*. 20. Serotypy leptospir pochodziły z muzeum przy Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej AM w Lublinie. Hodowle prowadzono na płynnym podłożu Korthofa. Podłoże przygotowywano globalnie i rozlewano do butli na 250 ml. Do wszystkich butli danej serii dodawano surowicę tego samego królika. Czas hodowli wynosił a) 7 i 14 dni, temp. 30°C, b) 10 dni, temp. 26°C. Badano przesącz podłoża jałowego oraz zakażonego leptospirami w różnym okresie hodowli. Z każdej butli hodowlanej, co pewien określony czas, sterylnie odlewano próbkę, sączono przez lejki Schotta G-5 i poddawano analizie chemicznej. Przesącz zagęszczano w ekzykatorze próżniowym, odbiałczano 96% etanolem, odwirowywano. Suchą pozostałość po odparowaniu rozpuszczano w 1 ml wodnego alkoholowego roztworu (96% etanol+woda redestylowana w stosunku 3:7). Tak przygotowany materiał наносzono ilościowo mikropipetką na bibułę Whatman nr 3. Skład jakościowy aminokwasów oznaczano metodą chromatografii bibulowej. Posługiwano się techniką wstępującą — jednokierunkową (32), krążkową (23, 24) oraz kombinacją wstępującej z krążkową wg Szczepaniaka (30, 31). Chromatogramy rozwijano dwukrotnie w układzie rozpuszczalników: butanol — kwas octowy lodowaty — woda redestylowana w stosunku 4:1:1, kolejno

Tab. 1. Wolne aminokwasy w przesączach hodowli *Leptospira icterohaemorrhagiae* łożu Korthofa  
Free aminoacids in the cultural filtrates of *Leptospira icterohaemorrhagiae* Wijnberg medium at 30°C

Lp.	Aminokwasy	Podłoże Korthofa	Po pierwszej dobie hodowli		W czwar hodo
			<i>L. ictero.</i> Wijnberg	<i>L. ictero.</i> 20	<i>L. ictero.</i> Wijnberg
1, 2.	Leucyna, izoleucyna	0,43 ±0,004	0,38 ±0,002	0,43 ±0,003	0,38 ±0,00
3.	Fenylalanina	0,18 ±0,007	0,14 ±0,002	0,12 ±0,003	0,14 ±0,004
4.	Walina	0,30 ±0,005	0,23 ±0,002	0,31 ±0,004	0,28 ±0,005
5.	Metionina	0,15 ±0,009	—	—	—
6.	Tryptofan	0	0	—	—
7.	Kwas α-aminomasłowy	0	—	—	—
8.	Tyrozyna	0,15 ±0,004	0,11 ±0,004	0,12 ±0,007	0,11 ±0,004
9.	Prolina	0,16 ±0,006	0,16 ±0,004	0,11 ±0,003	0,15 ±0,003
10.	Alanina	0,30 ±0,004	0,20 ±0,004	0,35 ±0,003	0,20 ±0,002
11.	Treonina	0,15 ±0,004	0,12 ±0,002	0,15 ±0,007	0,12 ±0,002
12.	Kwas glutaminowy	0,22 ±0,009	0,22 ±0,005	0,22 ±0,007	0,22 ±0,005
13.	Glicyna	0,30 ±0,005	0,25 ±0,006	0,20 ±0,005	0,26 ±0,003
14.	Seryna	0,25 ±0,009	0,25 ±0,005	0,25 ±0,008	0,25 ±0,009
15.	Kwas asparaginowy	0,15 ±0,003	0,09 ±0,002	0,12 ±0,009	0,10 ±0,002
16.	Arginina	0,18 ±0,004	0,10 ±0,004	0,14 ±0,006	0,10 ±0,006
17.	Asparagina	0	0	—	—
18.	Histydyna	0,18 ±0,003	0,15 ±0,008	0,02 ±0,006	0,15 ±0,003
19.	Lizyna	0,30 ±0,007	0,25 ±0,008	0,22 ±0,008	0,25 ±0,005
20.	Cystyna, cysteina	0,11 ±0,009	—	—	—

Stężenie aminokwasów w podłożu jałowym Korthofa i w przesączach poszczególnie arytmetyczne  $\bar{X}$  z kilku pomiarów (8—11), uwzględniono średni błąd kwadryczny swobody dla prawdopodobieństwa 95%. Aminokwas w ilościach śladowych = 0. Brak

Concentration of aminoacids is expressed as mg/ml of cultural uncellular filtrates. error of arithmetic mean and value of the Student's function, for 95% probability, aminoacid in the filtrate = —.

przez 29 i 31 godz. Wywoływano 0,15% acetonowym roztworem ninhydryny. Stosowano zimny test wg Opięńskiej-Blauth (21).  $\beta$ -aminokwasy oznaczano w temp. 80—105°C. Równoległe wywoływano chromatogramy 0,2% acetonowym roztworem izatyny (19). Identyfikacji aminokwasów na chromatogramach dokonywano przez porównywanie ich  $R_f$ , kształtu i odcieni z aminokwasami wzorcowymi, naniesionymi na ten sam arkusz bibuły. Stosowano w niektórych przypadkach odczynniki specyficzne, jak: pięcio-cyjano-żelazian sodu (15), odczynnik benzydynowy (5), odczynnik Pauly'ego (22) oraz test fluorescencyjny w analitycznej lampie kwarcowej z filtrem Wooda (3). W przypadku aminokwasów o bardzo zbliżonych  $R_f$ , posługiwano się metodą rechromatografii (2). Skład ilościowy aminokwasów oznaczano metodą kolorymetryczną, techniką elucyjną. Plamy poszczególnych aminokwasów, uprzednio wywołane na bibule, kompleksowano przez zanurzenie w acetonowym roztworze 0,2% chlorku miedziowego (25), wycinano, cięto na drobną sieczkę i eluowano w 75% metanolu. Pomiaru ekstynkcji dokonywano przy pomocy spektrokolorymetru (Spekol) przy długości fali 510 nm. Dla badanego aminokwasu każdorazowo wykreślano krzywe wzorcowe, za pomocą których oznaczano nieznaną stężenie. Otrzymane wyniki przeliczano w mg/ml podłoża hodowlanego. Z kilkunastu

Wijnberg i *Leptospira icterohaemorrhagiae* 20 prowadzonych na płynnym podłożu w temp. 30°C (mg/ml)

berg and *Leptospira icterohaemorrhagiae* strain 20, being cultured in Korthof's (mg/ml)

tej dobie wli	W siódmej dobie hodowli		W dziesiątej dobie hodowli		W czternastej dobie hodowli	
<i>L. ictero.</i> 20	<i>L. ictero.</i> Wijn- berg	<i>L. ictero.</i> 20	<i>L. ictero.</i> Wijn- berg	<i>L. ictero.</i> 20	<i>L. ictero.</i> Wijn- berg	<i>L. ictero.</i> 20
0,25 $\mp$ 0,006	0,40 $\mp$ 0,005	0,50 $\mp$ 0	0,40 $\mp$ 0	0,33 $\mp$ 0,003		0,40 $\mp$ 0,006
0,06 $\mp$ 0,005	0,20 $\mp$ 0,002	0,22 $\mp$ 0	0,20 $\mp$ 0,002	0,22 $\mp$ 0,005		0,24 $\mp$ 0,003
0,25 $\mp$ 0,002	0,31 $\mp$ 0,004	0,28 $\mp$ 0	0,25 $\mp$ 0,003	0,20 $\mp$ 0,004		0,30 $\mp$ 0,005
—	0,03 $\mp$ 0,003	0,09 $\mp$ 0	0	0		—
—	—	—	—	—		—
—	0	—	—	—		—
0,07 $\mp$ 0,003	0,15 $\mp$ 0,003	0,13 $\mp$ 0,009	0,15 $\pm$ 0,009	0,09 $\pm$ 0,002		0,16 $\pm$ 0,004
0,11 $\mp$ 0,004	0	0,11 $\mp$ 0,003		0,11 $\pm$ 0,006		0,11 $\pm$ 0,003
0,15 $\mp$ 0,009	0,21 $\mp$ 0,003	0,40 $\mp$ 0,006	0,22 $\pm$ 0,006	0,31 $\pm$ 0,003		0,43 $\pm$ 0,006
0,09 $\pm$ 0,003	0	0,20 $\pm$ 0,003	0	0,20 $\pm$ 0,004		0,20 $\pm$ 0,002
0,12 $\pm$ 0,004	0,28 $\pm$ 0,005	0,34 $\pm$ 0,006	0,28 $\pm$ 0,009	0,35 $\pm$ 0,009		0,35 $\pm$ 0,006
0,20 $\pm$ 0,009	0,28 $\pm$ 0,004	0,29 $\pm$ 0,002	0,28 $\pm$ 0,009	0,35 $\pm$ 0,006		0,32 $\pm$ 0,003
0,25 $\pm$ 0,003	0,11 $\pm$ 0,005	0,28 $\pm$ 0,003	0,11 $\pm$ 0,005	0,28 $\pm$ 0,003		0,20 $\pm$ 0,004
0,04 $\pm$ 0,001	0,12 $\pm$ 0,004	0,11 $\pm$ 0,006	0,10 $\pm$ 0,009	0,10 $\pm$ 0,006		0,15 $\pm$ 0,003
0,07 $\pm$ 0,007	0,12 $\pm$ 0,006	0,11 $\pm$ 0,005	0,12 $\pm$ 0,009	0,15 $\pm$ 0,004		0,17 $\pm$ 0,002
—	—	—	—	—		—
0	0,16 $\pm$ 0,004	0,08 $\pm$ 0,003	0,20 $\pm$ 0,009	0,16 $\pm$ 0,005		0,11 $\pm$ 0,004
0,18 $\pm$ 0,003	0,14 $\pm$ 0,002	0,27 $\pm$ 0,005	0,14 $\pm$ 0,009	0,15 $\pm$ 0,004		0,22 $\pm$ 0,009
—	—	—	—	—		—

nie badano

nych hodowli wyrażono w mg/ml badanego przesączu. Podane wyniki stanowią średniej arytmetycznej i wartość funkcji Studenta przy odpowiedniej liczbie stopni aminokwasu =—.

The results make arithmetic X mean from several measurements (8—11), the average have been taken into consideration. Vestigial quantities of aminoacid =0. No

równoległych pomiarów wyliczono średnie arytmetyczne  $\bar{X}$ , ustalano przedział ufności  $U$ , uwzględniając średni błąd kwadryczny  $S_x$  — średniej arytmetycznej i wartość funkcji  $t$  Studenta przy odpowiedniej liczbie stopni swobody dla poziomu prawdopodobieństwa 95% (18).

### BADANIA MIKROBIOLOGICZNE

Prowadzono kontrolę czystości hodowli: a) obserwowano pojawianie się mętu — dowód przerostu inną florą bakteryjną, b) oglądano w ciemnym polu preparaty z hodowli. Komórki leptospirowe liczono w komorze Petroff-Hansena w 20 kwadratach, stosując ciemne pole widzenia (28).

### Wyniki badań

Analiza podłoża jałowego wykazała obecność 20 wolnych aminokwasów, w tym 2 w ilościach śladowych. Analiza drugiej serii — 18 (surowica od innego królika). W większości przypadków uzyskano na bibule dobry rozdział aminokwasów po zastosowaniu techniki jednokierunkowej wstępującej. Zmieniając stężenie jonów wodoroni-

Tab. 2. Wolne aminokwasy w przesączach hodowli *Leptospira canicola* i *Leptospira* Free aminoacids in the cultural filtrates of *Leptospira canicola* and *Leptospira patoc*,

Lp.	Aminokwasy	Podłoże Korthofa	Po pierwszej dobie hodowli		W czwar hodo
			<i>Leptospira canicola</i>	<i>Leptospira patoc</i>	<i>Leptospira canicola</i>
1, 2.	Leucyna, izoleucyna	0,43 $\mp$ 0,004	0,39 $\mp$ 0,004	0,25 $\mp$ 0,005	0,40 $\mp$ 0,003
3.	Fenylalanina	0,18 $\mp$ 0,007	0,13 $\mp$ 0,003	0,12 $\mp$ 0,002	0,13 $\mp$ 0,002
4.	Walina	0,30 $\mp$ 0,005	0,20 $\mp$ 0,004	0,20 $\mp$ 0,004	0,15 $\mp$ 0,005
5.	Metionina	0,15 $\mp$ 0,009	—	—	—
6.	Tryptofan	0	0	—	0
7.	Kwas $\alpha$ -aminomasłowy	0	—	—	—
8.	Tyrozyna	0,15 $\mp$ 0,004	0,11 $\mp$ 0,004	0,10 $\mp$ 0,004	0,11 $\mp$ 0,009
9.	Prolina	0,16 $\mp$ 0,008	0,15 $\mp$ 0,003	0,16 $\mp$ 0,007	0,15 $\mp$ 0,006
10.	Alanina	0,30 $\mp$ 0,004	0,36 $\mp$ 0,002	0,20 $\mp$ 0,005	0,31 $\mp$ 0,003
11.	Treonina	0,15 $\mp$ 0,003	0,15 $\mp$ 0,004	0,10 $\mp$ 0,003	0,12 $\mp$ 0,003
12.	Kwas glutaminowy	0,22 $\mp$ 0,009	0,22 $\mp$ 0,009	0,13 $\mp$ 0,003	0,22 $\mp$ 0,005
13.	Glicyna	0,30 $\mp$ 0,005	0,20 $\mp$ 0,004	0,26 $\mp$ 0,009	0,26 $\mp$ 0,007
14.	Seryna	0,25 $\mp$ 0,004	0,25 $\mp$ 0,007	0,25 $\mp$ 0,009	0,25 $\mp$ 0,005
15.	Kwas asparaginowy	0,15 $\mp$ 0,003	0,15 $\mp$ 0,003	0,11 $\mp$ 0,004	0,15 $\mp$ 0,009
16.	Arginina	0,18 $\mp$ 0,004	0,15 $\mp$ 0,004	0,13 $\mp$ 0,002	0,15 $\mp$ 0,002
17.	Asparagina	0	—	—	—
18.	Histydyna	0,18 $\mp$ 0,003	0,12 $\mp$ 0,003	0,19 $\mp$ 0,006	0,15 $\mp$ 0,003
19.	Lizyna	0,30 $\mp$ 0,007	0,25 $\mp$ 0,008	0,23 $\mp$ 0,005	0,12 $\mp$ 0,009
20.	Cystyna-cysteina	0,11 $\mp$ 0,009	—	0,07 $\mp$ 0,004	—

Objaśnienia patrz tab. 1.

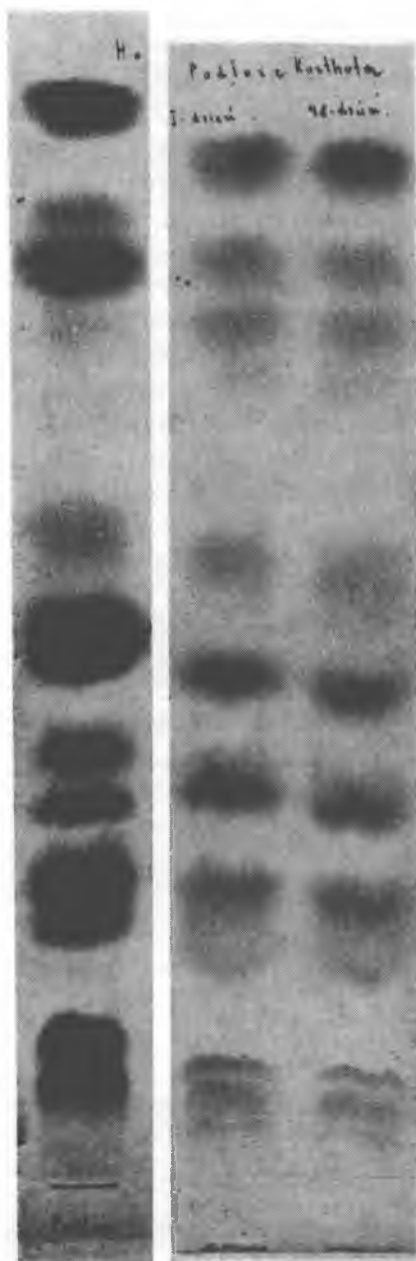
Explanation see Table 1.

wych w czasie procesu migracji udało się przy pomocy tej metody rozdzielić treoninę i kwas glutaminowy (ryc. 1) oraz aminokwasy zasadowe (ryc. 2). Analiza kontrolna podłoża jałowego bezpośrednio po przyrządzeniu i po upływie kilkudziesięciu dni nie wykazała różnic w składzie wolnych aminokwasów (ryc. 2).

W podłożach hodowli wszystkich badanych serotypów stwierdzono po pierwszej dobie inkubacji całkowity ubytek metioniny i w większości przypadków cystyny-cysteiny (wyjątek hodowla *L. patoc*), tab. 1. Stężenie pozostałych aminokwasów zmieniało się nieregularnie w ciągu całego okresu inkubacji. Ubytek danego aminokwasu kształtował się różnie w poszczególnych okresach hodowli i odmiennie u każdego serotypu, a nawet szczepu (tab. 1 i 2). W podłożach hodowli *Leptospira canicola* największe zapotrzebowanie na aminokwasy obserwowano w siódmej i pierwszej dobie. U *Leptospira icterohaemorrhagiae* 20, w czwartej i pierwszej dobie, a u *Leptospira icterohaemorrhagiae* Wijnberg i *Leptospira patoc* w pierwszej dobie. W stosunku do pozostałych aminokwasów w większych ilościach pobierana była obok aminokwasów siarkowych leucyna, alanina, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, czasem walina, arginina, lizyna, glicyna. Niektóre serotypy w pewnych okresach hodowli wykazywały

*patoc* prowadzonych na płynnym podłożu Korthofa w temp. 30°C (mg/ml)  
being cultured in liquid Korthof's method at 30°C (mg/ml)

tej dobie wli	W siódmej dobie hodowli		W dziesiątej dobie hodowli		W czternastej dobie hodowli	
<i>Leptospira patoc</i>	<i>Leptospira canicola</i>	<i>Leptospira patoc</i>	<i>Leptospira canicola</i>	<i>Leptospira patoc</i>	<i>Leptospira canicola</i>	<i>Leptospira patoc</i>
0,28 ±0,004	0,17 ±0,00	0,28 ±0,009	0,40 ±0,003		0,40 ±0,003	
0,12 ±0,003	0,05 ±0,00	0,12 ±0,004	0,13 ±0,003		0,12 ±0,009	
0,21 ±0,004	0,05 ±0,00	0,21 ±0,005	0,13 ±0,002		0,12 ±0,002	
—	0	—	0		0	
—	—	—	0		0	
0,10 ±0,002	0,06 ±0,004	0,10 ±0,002	0,12 ±0,008		0,12 ±0,002	
0,13 ±0,005	0,15 ±0		0,09 ±0,006		0,12 ±0,006	
0,22 ±0,003	0,14 ±0,005	0,22 ±0,003	0,36 ±0,003		0,31 ±0,002	
0,11 ±0,003	0,05 ±0,003	0,11 ±0,002	0,12 ±0,008		0,19 ±0,003	
0,25 ±0,005	0,10 ±0,004	0,17 ±0,005	0,21 ±0,003		0,13 ±0,005	
0,26 ±0,002	0,12 ±0,005	0,28 ±0,004	0,21 ±0,004		0,21 ±0,007	
0,25 ±0,005	0,25 ±0,009	0,25 ±0,004	0,25 ±0,008		0,25 ±0,005	
0,10 ±0,002	0,05 ±0,002	0,06 ±0,002	0,12 ±0,004		0,12 ±0,003	
0,10 ±0,004	0,10 ±0,009	0,08 ±0,004	0,16 ±0,006		0,15 ±0,003	
—	—	—	—		—	
0,14 ±0,009	0,08 ±0,003	0,10 ±0,004	0,11 ±0,003		0,11 ±0,004	
0,25 ±0,002	0,14 ±0,002	0,27 ±0,009	0,21 ±0,009		0,22 ±0,009	
—	—	—	—		—	



Ryc. 1

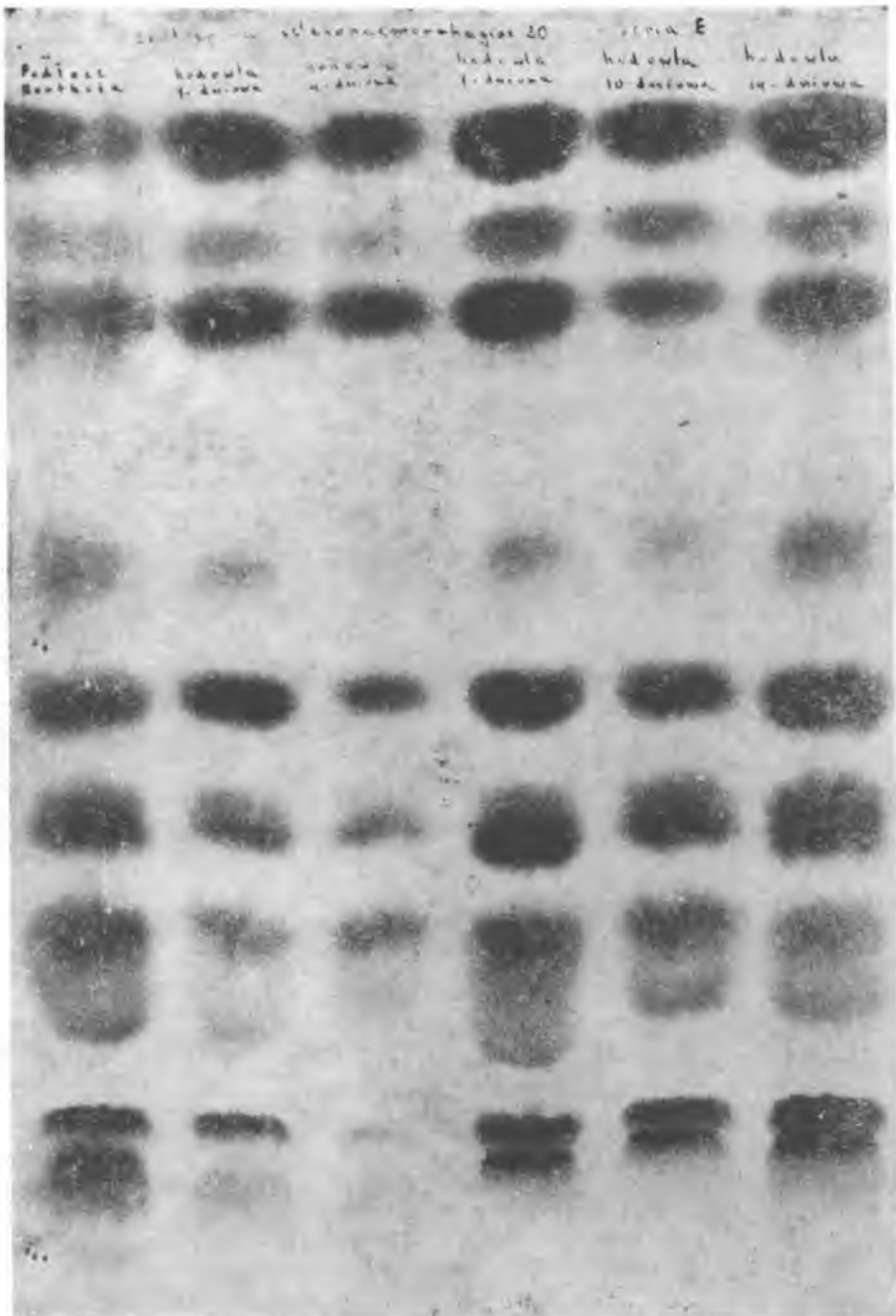
Ryc. 2

Ryc. 1. Chromatogram przedstawiający wolne aminokwasy w jałowym podłożu Korthofa w temp. 30°C (widoczny rozdział treoniny i kwasu glutaminowego oraz glicyny, seryny i kwasu asparaginowego)

Chromatogram showing free amino acids in a sterilized Korthof's medium at 30°C (separation of treonine and glutamic acid as well as glycine serine and aspartic acid may be observed)

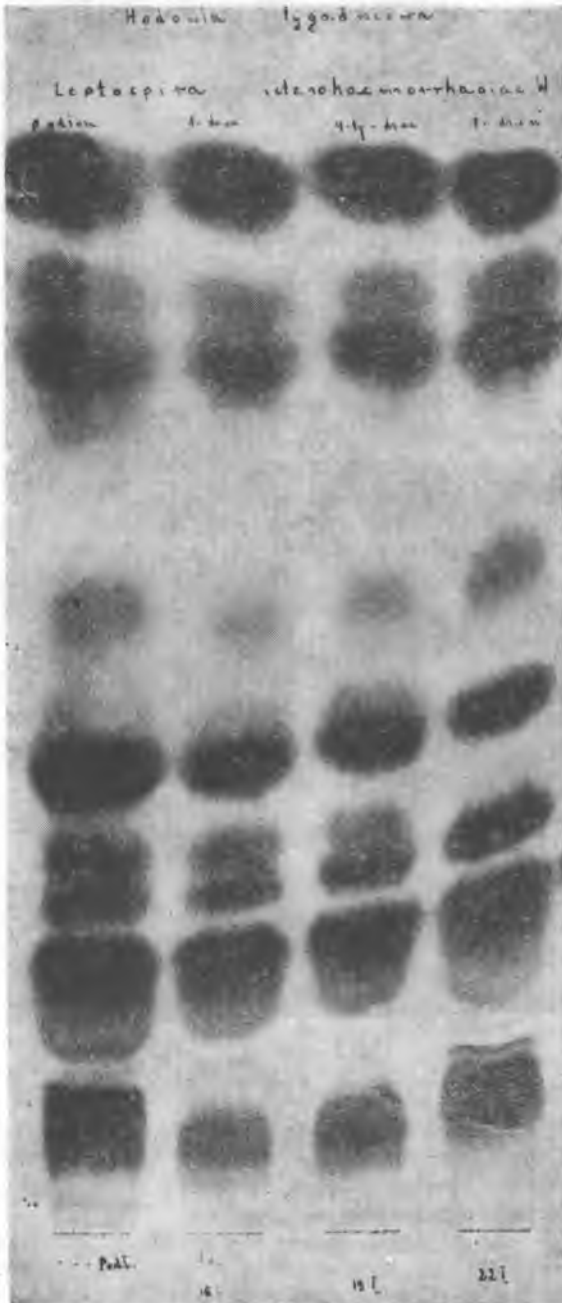
Ryc. 2. Chromatogram przedstawiający wolne aminokwasy w jałowym podłożu Korthofa w temp. 30°C, bezpośrednio po sporządzeniu podłoża i po upływie 48 dni (widoczny rozdział aminokwasów zasadowych)

Chromatogram showing free amino acids in a sterilized Korthof's medium at 30°C immediately after preparing and after 48 days (separation of basic aminoacids may be observed)



Ryc. 3. Chromatogram przedstawiający porównawczo skład wolnych aminokwasów w podłożu jałowym Korthofa i w przesączach hodowli w temp. 30°C po upływie jednej doby, w czwartej doby, w siódmej doby, w dziesiątej doby i w czternastej doby. Hodowla *Leptospira icterohaemorrhagiae* 20

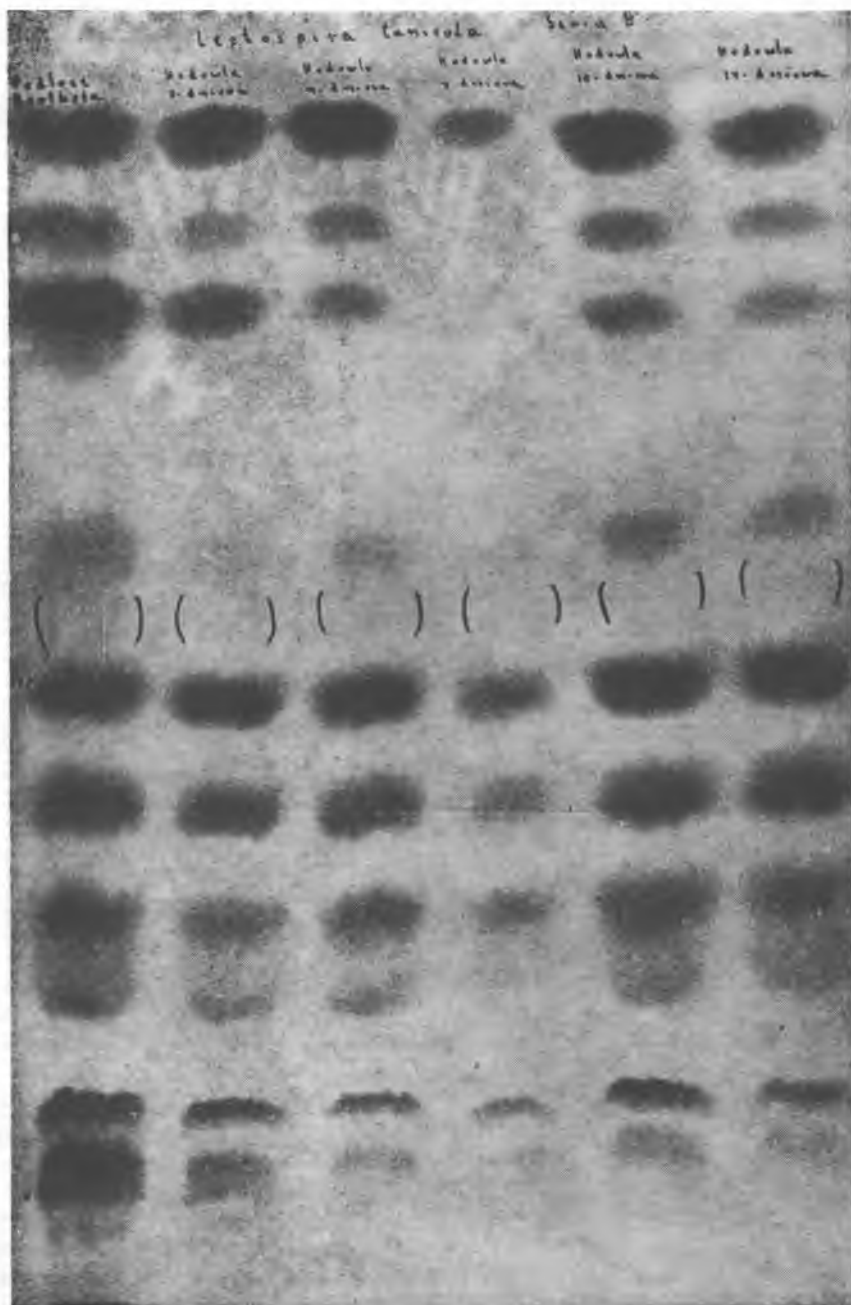
Comparative chromatogram showing accumulation of free aminoacids in a liquid Korthof's medium and in the cultural filtrates at 30°C after one day, four, seven, ten and fourteen days. *Leptospira icterohaemorrhagiae* 20



Ryc. 4. Chromatogram przedstawiający porównawczo skład wolnych aminokwasów w podłożu jałowym Korthofa i w przesączach hodowli *Leptospira icterohaemorrhagiae* Wijnberg w temp. 30°C po upływie jednej doby, w czwartej dobie, w siódmej dobie

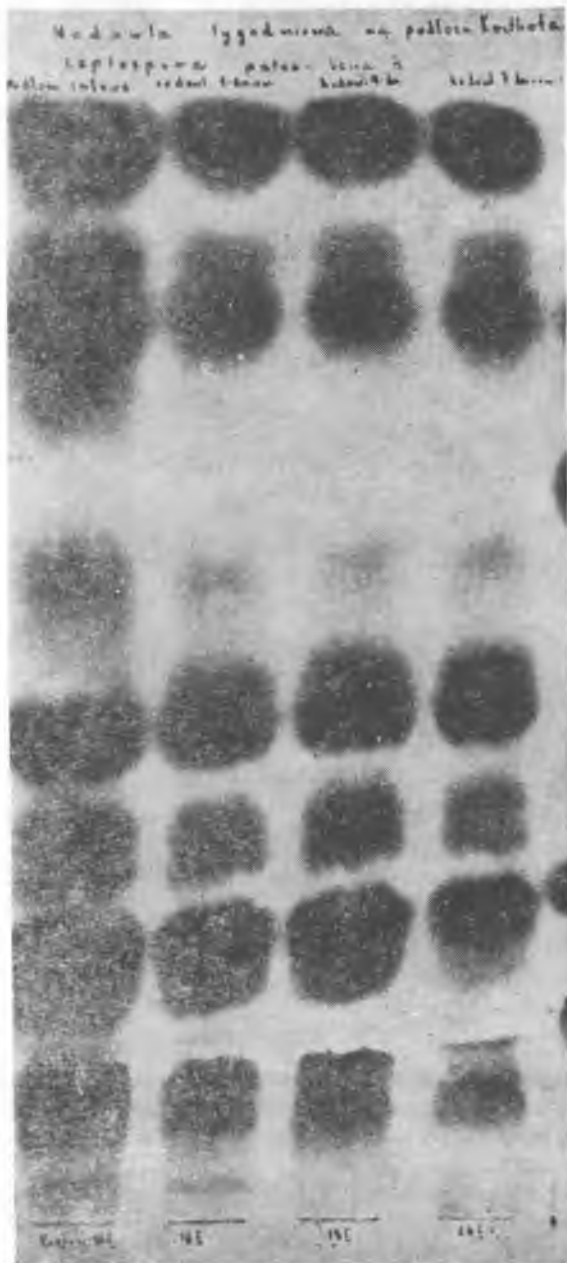
Comparative chromatogram showing an accumulation of free aminoacids in a sterilized Korthof's medium and in the cultural filtrates of *L. icterohaemorrhagiae* Wijnberg at 30°C after one, four and seven days





Ryc. 5. Chromatogram przedstawiający porównawczo skład wolnych aminokwasów w podłożu jałowym Korthofa i w przesączach hodowli *Leptospira canicola* w temp. 30°C po upływie jednej doby, w czwartej dobie, w siódmej dobie, w dziesiątej dobie, w czternastej dobie

Comparative chromatogram showing an accumulation of free aminoacids in a sterilized Korthof's medium and in the cultural filtrates of *Leptospira canicola* at 30°C after one, four, seven, ten and fourteen days



Ryc. 6. Chromatogram przedstawiający porównawczo skład wolnych aminokwasów w jałowym podłożu Korthofa i w przesączach hodowli *Leptospira patoc* w temp. 30°C po upływie jednej doby, w czwartej dobie, w siódmej dobie

Comparative chromatogram showing an accumulation of free aminoacids in a sterilized Korthof's medium and the cultural filtrates of *Leptospira patoc* at 30°C after one, four, seven days

swoiste zapotrzebowanie na dany aminokwas, np. *Leptospira icterohaemorrhagiae* — szczep 20 w pierwszej dobie na histydynę, a szczep W i j n b e r g w siódmej — na prolinę i treoninę.

Skład wolnych aminokwasów w poszczególnych etapach hodowli obrazują załączone fotografie chromatogramów (ryc. 3—6). W hodowlach prowadzonych w temp. 30°C zużycie aminokwasów było proporcjonalne do ilości komórek tylko u *L. icterohaemorrhagiae* 20 w czwartej dobie i *Leptospira canicola* w siódmej dobie. W hodowlach prowadzonych w temp. 26°C obserwowano mniejsze zużycie aminokwasów z podłoża (tab. 3). W pewnych okresach inkubacji stężenie aminokwasów wzrastało.

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Podczas hodowli leptospir obserwowano ubytek wolnych aminokwasów z płynnego podłoża Korthofa, co sugeruje, że badane serotypy leptospir pobierały wolne aminokwasy. Obserwacje dotyczyły tylko tych aminokwasów, które znajdowały się w surowicy i peptonie wchodzącym w skład podłoża (dodatkowych aminokwasów nie wprowadzano do hodowli). Nie spotkano publikacji dotyczących wolnych aminokwasów podłoża Korthofa podczas inkubacji leptospir, uwzględniających równocześnie właściwości serotypowe oraz wiek i temperaturę hodowli. Natomiast wielu autorów badało wpływ wprowadzonych do podłoża aminokwasów na szybkość wzrostu (4, 8, 28, 29), oddychanie (6, 17) i inne procesy biochemiczne. Wyniki uzyskane przez różnych autorów były często kontrowersyjne. Potwierdza to tylko fakt, że leptospiry dla tego typu badań stanowią niezmiernie trudny model. W naszych doświadczeniach jako punkt wyjściowy przyjęto skład wolnych aminokwasów, znajdujących się w podłożach jałowych, przyrządzonych globalnie dla wszystkich hodowli danej serii. Zachowując jednakowe warunki badano przesącze z różnych okresów hodowli. Wnioski wyciągano na podstawie różnic dotyczących stężeń aminokwasów w poszczególnych etapach tej samej hodowli.

Opierając się na uzyskanych wynikach, należy wnioskować, że aminokwasy siarkowe: metionina i cystyna były pobierane w pierwszej kolejności przez wszystkie serotypy leptospir. Ger h a r d i B a l l (7) obserwowali pobieranie metioniny z podłoża Schüffnera przez *Leptospira canicola*. S t a l h e i m i W i l s o n (28) stwierdzili stymulujące jej działanie na wzrost leptospir. Natomiast G r e e n e (8), S t u a r t (29), C h a n g (4) tego zjawiska w swoich badaniach nie obserwowali. Pobudzające działanie cystyny stwierdził O n o (20). W naszych doświadczeniach obserwowaliśmy w czasie hodowli w mniejszym lub większym stopniu ubytek niemal wszystkich aminokwasów występujących w podłożu jałowym

Korthofa. Wielkość uzależniona była od serotypu i okresu hodowli. W następnej dobie, po intensywnym zapotrzebowaniu, leptospiry nie pobierały aminokwasów wcale albo tylko w minimalnych ilościach. W kolejnym okresie zapotrzebowania ubytek aminokwasów był niewielki, raczej pojedynczy, jakby uzupełniający. W niektórych etapach hodowli w nieco większych ilościach pobierana była z podłoża leucyna, alanina, walina, kwas asparaginowy, następnie glicyna i lizyna. Johnson i Rogers (13) w doświadczeniach nad *Leptospira pomona* stwierdzili przyswajanie radioaktywnej leucyny, alaniny, waliny, argininy, fenyloalaniny, glicyny.

Omawiając zapotrzebowanie na aminokwasy warto zwrócić uwagę, że w naszych doświadczeniach kwas glutaminowy nie był aminokwasem pobieranym w pierwszej kolejności. Jego ubytek z podłoża obserwowano dopiero około czwartej—siódmej doby, lub wcale, jak w hodowlach *L. icterohaemorrhagiae* Wijnberg. Nie był też pobierany w ilościach większych jak leucyna czy alanina. Według Hoare (11), kwas glutaminowy jest podstawowym aminokwasem biorącym udział w metabolizmie drobnoustrojów, a Heyman i Sieffert (10) uważają go za jeden z pierwszych produktów asymilacji i wyjściową substancję do syntezy białka.

W równoległych hodowlach tego samego serotypu, aminokwasy pobierane w ilościach do 0,05 mg/ml, często były różne. Wydaje się, że w stosunku do większości aminokwasów jest kwestią przypadku, że właśnie ten, a nie inny, został pobrany. Możliwe, że odgrywają tu rolę cechy indywidualne, niemal osobnicze leptospir. Należy również przypuszczać, że prawdziwy obraz zapotrzebowania na aminokwasy w podłożu surowicznym maskują w pewnym stopniu równoczesne przyrosty stężenia aminokwasów. Obniżenie temperatury hodowli częściowo zahamowało ubytek wolnych aminokwasów z podłoża. Pobieranie aminokwasów było mniej masowe i jakby opóźnione, zwłaszcza w hodowlach *Leptospira patoc*. Jest to zjawisko o tyle ciekawe, że *Leptospira patoc*, jako serotyp saprofityczny, ma mniejsze wymagania odżywcze (1, 16) i większą odporność na działanie i wahania temperatury. Obserwowano również, że w tych podłożach, w których nie było aminokwasów siarkowych, chętniej pobierany był kwas glutaminowy.

#### Wnioski

1. Prowadzone obserwacje wykazały, że leptospiry pobierają wolne aminokwasy z podłoża Korthofa.
2. Zapotrzebowanie na dany aminokwas jest niewielkie i nie przebiega w sposób ciągły. Pomiedzy serotypami istnieją pewne różnice jakości-

we i ilościowe w pobieraniu wolnych aminokwasów z podłoża. Nie można ich jednak traktować jako cech stałych. Badania wykazały, że odchylenia zachodzące pomiędzy serotypami w zapotrzebowaniu na aminokwasy nie są większe jak między szczepami tego samego serotypu. W związku z tym na podstawie ubytków aminokwasów z podłoża nie można dla celów taksonomicznych tworzyć diagramu.

3. Kontrowersyjność wyników uzyskanych przez różnych autorów wpływa z warunków prowadzonych doświadczeń, okresu badań oraz właściwości biologicznych leptospir.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Baudieri B.: Z. Vitamin-Hormon-Fermentforsch, **11**, 299—309, 1960/61.
1. Borkowski T.: Acta Biochim. Polon., **3**, 333—343, 1956.
3. Bursztein E. A.: Biofizyka, **6**, 753—763, 1961.
4. Chang S. L.: Infect Diseases, **81**, 35—47, 1947.
5. Cifonelli I. A., Smith F.: Anal. Chem., **27**, 1501—1502, 1955.
6. Fulton I. D., Sponer D. F.: Exptl. Parasitol., **5**, 154—177, 1956.
7. Gerhard M. R., Ball M. G.: J. Bacteriol., **77**, 17—22, 1959.
8. Greene M. R.: J. Bacteriol., **50**, 39—45, 1945.
9. Hein H.: Zbl. Bact. Orig., **156**, 249—251, 1950/51.
10. Heyman G., Siefert N.: Zbl. Immunforsch **116**, 257—275, 1959.
11. Hoare D. S.: J. Gen. Microb. **32**, 157—161, 1963.
12. Johnson R. C., Gary C.: J. Bacteriol., **83**, 668—672, 1962.
13. Johnson R. C., Rogers P.: Arch. of Biochem. Biophys. **107**, 459—470, 1964.
14. Johnson R. C., Wilson J. B.: J. Bacteriol. **80**, 406—411, 1960.
15. Krzeczowska I., Misiuna D.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D **16**, 299—305, 1961.
16. Mailloux M., Berthe Kolochime Erber; Annales d'Institut Pasteur, **100**, 390—395, 1961.
17. Marshall P. B.: J. Infect. Diseases **84**, 150—152, 1949.
18. Minczewski J., Marzenko Z.: Chemia analityczna. PWN, Warszawa 1965, s. 48 (Statystyczne kryteria oceny wyników).
19. Noworytko J., Sarnecka-Keller I.: Acta Biochim. Polon. **2**, 91—105, 1955.
20. Ono S.: Fukuoka Acta Med. **31**, 155—158, 1938.
21. Opieńska-Blauth J., Kowalska H., Petruszewicz M.: Acta Biochim. Polon. **3**, 557—580, 1956.
22. Opieńska-Blauth J., Tomaszewski L.: Metody chromatograficzne w badaniach aminokwasów ze szczególnym uwzględnieniem amino acydurii. PZWL, Warszawa 1968, s. 117.
23. Robinson D. L. H., Targett G. A. T.: Nature **194**, 30—31, 1961.
24. Ruszkowski M.: Pol. Tyg. Lek. **13**, 1963—1967, 1958.
25. Sarnecka-Obacz M.: Chem. Anal. **6**, 419—428, 1961.
26. Scheller S.: Med. Wet. **2**, 113—115, 1962.
27. Shenberg E.: J. Bacteriol. **93**, 1598—1606, 1967.
28. Stalheim O. H. V., Wilson J. B.: J. Bacteriol. **88**, 48—54, 1964.
29. Stuart D.: J. Path. Bact. **58**, 343—349, 1946.

30. Szczepaniak S., Krzeczowska I.: Chem. Anal. **11**, 1197—1202, 1966.
31. Szczepaniak S.: Pol. Tyg. Lek. **27**, 759—762, 1972.
32. Williams R. J., Kirby H.: Science **107**, 481—483, 1964.

Otrzymano 27 XI 1976.

#### РЕЗЮМЕ

Проведено наблюдения фильтратов выращивания: *Leptospira patoc*, *Leptospira canicola* и *Leptospira icterohaemorrhagiae*. После суточного выращивания у всех исследованных серотипов обнаружено полное израсходование из среды серных аминокислот. По сравнению с остальными аминокислотами в самом большом количестве израсходовались аланин, валин, лейцин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Израсходование данной аминокислоты проходило по разному в зависимости от срока, температуры выращивания и серотипа. Учитывая своеобразную биохимическую индивидуальность лептоспир, выступающие между серотипами разницы в потребности аминокислот, нельзя считать постоянными.

#### SUMMARY

Observations were performed in the cultural filtrates of *L. patoc*, *L. canicola* and *L. icterohaemorrhagiae*. After 24 hours of culturing all the examined serotypes were shown to entirely utilize sulphur — containing aminoacids. As for the rest of the aminoacids: alanine, valine, leucine, aspartic acid and glutamic acids were utilized in larger quantities. A decrease in any of the above given aminoacids was not only dependent upon time and temperature of cultures but also on the serotype. With regard to the specific biochemical individuality of leptospiral the differences between the serotypes in reference to the aminoacids requirements cannot be considered as constant.