

---

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

Irena KRZECZKOWSKA, Teresa WACH

**Przemiana wolnych aminokwasów hodowli *B. coli* typu jelitowego (I)**

**Обмен свободных аминокислот культуры кишечного типа *B. coli* (I)**

**The Transformation of Free Amino Acids of *B. coli* Cultures  
(Intestinal Type) (I)**

Liczne badania wykazały, że większość drobnoustrojów zdolna jest do syntezy niemal wszystkich aminokwasów, znamy jednak dotychczas przebieg syntezy tylko niektórych. Wiemy także, że gatunki bakterii najbardziej upośledzone pod względem zdolności syntetyzowania wymagają doprowadzania gotowych aminokwasów. Inne bakterie, przebywając w środowisku, w którym znajdują gotowe aminokwasy, przyswajają je i po pewnym czasie tracą zdolność do samodzielnej syntezy. Rozwój ich wówczas jest możliwy tylko wtedy, gdy niezbędne aminokwasy zostaną doprowadzone z zewnątrz.

Badania z izotopami pozwoliły zauważyć, że przeważające w komórce aminokwasy: kwas asparaginowy i kwas glutaminowy (2) są pierwszym produktem w syntezie białka (1, 6). Nie stwierdzono jednak dokładnie czy aminokwasy dostarczane z zewnątrz są zużywane bez przeróbki do budowy plazmy bakterii, po prostu wbudowane, czy też ulegają procesowi dezaminacji (5). Niektórzy badacze podają, że 1) pewne drobnoustroje wymagają tych, a nie innych aminokwasów, 2) inne wymagają równocześnie kilku aminokwasów (3), 3) niektóre bakterie lepiej rosną w mieszaninie aminokwasów niż w jednym aminokwasie o tym samym stężeniu (5). Nie można też przeoczyć faktu, że niektóre aminokwasy są zapotrzebowywane przez bakterie jako organiczne substancje czynne, np. histydyna. Zaobserwowano również, że aminokwasy alifatyczne są łatwiej asymilowane niż aminokwasy zawierające zamknięte pierścienie.

Wszystkie przytoczone zagadnienia posiadają duże znaczenie dla poznania przebiegu przemiany materii, a ich niedostateczna znajomość zachęca do przeprowadzenia dalszych badań.

Celem naszej pracy było przebadanie:

1) czy (przy zestawie podstawowym aminokwasów) *B. coli* typu jelitowego w jednakowym stopniu przyswaja wszystkie wolne aminokwasy znajdujące się w podłożu, czy też istnieje wybiórczość,

2) w jakiej kolejności *B. coli* asymiluje gotowe aminokwasy wprowadzone do pożywki,

3) czy fakt przyswajania tych, a nie innych aminokwasów jest charakterystyczny dla całego typu, czy też istnieją różnice w zapotrzebowaniu na jakiś aminokwas u poszczególnych szczepów.

#### CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA. MATERIAŁ I METODA

##### Szczepy.

Doświadczenia przeprowadzano z czterema szczepami *B. coli* typu jelitowego: I) szczep wzorcowy, II) szczep hemolizujący nr 3596, III) szczep hemolizujący nr 3594, IV) szczep nie hemolizujący nr 3594. Szczepy te (poza wzorcowym) wyizolowano z moczu dzieci. *B. coli* wyizolowano na pożywkę Endo, a następnie przesiano na podłoże doświadczalne.

##### Podłoże doświadczalne.

Jako podłoże był użyty bulion wołowy, częściowo odtłuszczony, bezcukrowy, beżeptydowy. pH podłoża wahało się w granicach 6,3—6,5.

##### Hodowle.

Czas trwania hodowli wynosił od 72—96 godzin w temp. 37°C. Próby do badań pobierano co 24 godziny, preparaty mikroskopowe barwiono metodą Grama.

##### Chromatografia rozdzielcza bibułowa.

Wolne aminokwasy podłoża i przesączy rozdzielano przy pomocy bibułowej chromatografii rozdzielczej, stosując technikę wstępującą według Williamsa i Kirby (7) na bibule Whatman nr 3 w arkuszach o wym. 47 × 50 cm. Jako rozpuszczalnika używano układu Patridge'a: n-butanol—kwas octowy lodowaty—woda w stosunku objętościowym 4:1:1. Chromatografię przeprowadzano w kamerach dokładnie uszczelnionych. Chromatogramy wywoływano 0,15% acetonowym roztworem ninhydryny oraz 0,2% acetonowym roztworem izatyny z dodatkiem kwasu octowego (4). Rechromatografię wykonywano metodą krążkową. Rozpuszczalniki przed użyciem świeżo destylowano. Zawsze używano wodę redestylowaną.

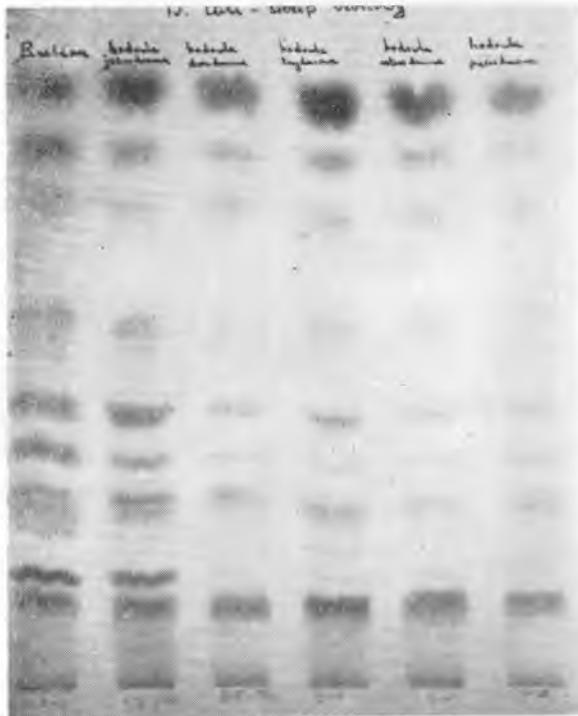
##### Oznaczenia kolorymetryczne.

Po wywołaniu i zidentyfikowaniu aminokwasów na chromatogramach odpowiadających kolejnym dniom hodowli poszczególne aminokwasy wycinano z arkuszy, cięto na drobniutkie paseczki i zalewano 75% alkoholem metylowym. Ekstynkcję odczytywano na kolorymetrze firmy Hilger, London.

#### BADANIA WŁASNE

Podłoże doświadczalne rozlewano do butli Calmetta o pojemności 250 ml, wyjaławiano, a następnie posiewano zawiesinę *B. coli* w ilości 0,3 ml na butlę (każdy szczep w kilku powtórzeniach). Czas hodowli

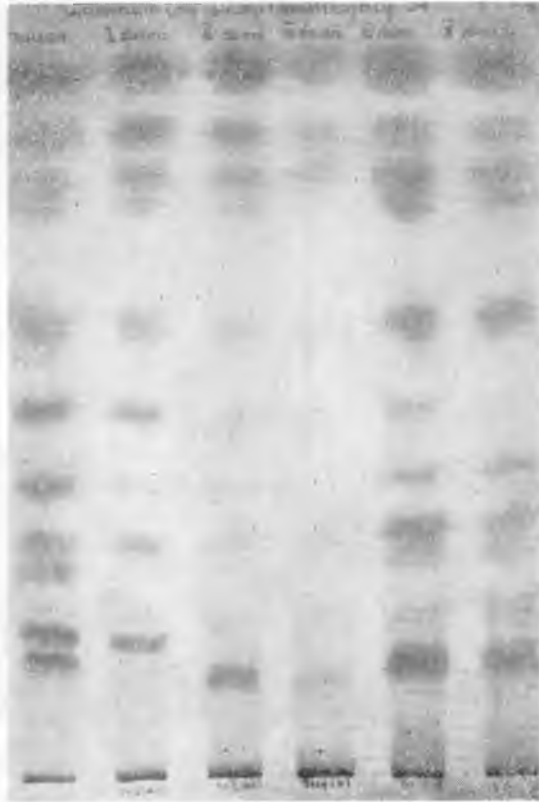
wynosił od 72 do 96 godzin w temp. 37°C. W czasie trwania hodowli co 24 godziny kontrolowano pH podłoża. Okazało się, że po 24 godzinach nastąpiło nieznaczne zakwaszenie środowiska (pH 6,3—6,1), w ciągu dalszych godzin hodowli nie stwierdzono zmian w wartości pH. W celu porównania wyników badania wykonywano ze wszystkimi czterema szczepami równocześnie. Dla kontroli przeprowadzano również doświadczenia



Ryc. 1. Chromatogram wolnych aminokwasów podłoża i przesączy (od 1 do 5 dnia) hodowli *B. coli* szczepu wzorcowego  
Chromatogram of free amino acids of the medium and filtrate of the culture of *B. coli* standard strain (up to 5th day)

z podłożem nie zasianym. Płyn hodowli oddzielono od komórek bakteryjnych przy pomocy wirowania, następnie ogrzewano go na łaźni wodnej w ciągu 30 minut w temp. około 100°C i odparowywano pod promiennikiem podczerwonym do 1/2 pierwotnej objętości. (Odległość promiennika od parowniczkki 5—6 cm). Tak przygotowany materiał наносono mikropipetką na bibułę Whatman nr 3 w ilości 0,09 ml na pasmo i wolne aminokwasy rozdzielano techniką wstępującą. Używano arkuszy bibuły o wymiarach 47 cm × 50 cm, nakraplając badany materiał w odległości 4 cm od dolnego brzegu bibuły. Długość nakraplanych pasm i odległość

między nimi wynosiła 2,5 cm. W czasie nakraplania chromatogramy suszono suszarką fryzjerską (foen). Obok badanego materiału na tym samym arkuszu bibuły nakraplano sztuczne mieszaniny wzorcowych aminokwasów („mapki”). Poszczególne „mapki” składały się przeciętnie z 5—6 aminokwasów różniących się między sobą wielkością  $R_f$ . Arkusze bibuły z nakroplonym materiałem i wzorcowymi mieszaninami wkładano do



Ryc. 2. Chromatogram wolnych aminokwasów przesączy (od 1 do 5 dnia) hodowli *B. coli* szczepu hemolizującego nr 3594  
Chromatogram of free amino acids of filtrates of the culture of *B. coli* nonhemolytic strain No. 3594 (up to 5th day)

kamer, w których w płytkach Petriego znajdował się rozpuszczalnik o wyżej podanym składzie. Bibułę zanurzano na głębokość 1,5 cm. Chromatogramy rozwijano trzykrotnie w temp. pokojowej; każde rozwinięcie trwało 26—28 godzin. Gotowe chromatogramy wywoływano przy pomocy 0,15% acetonowego roztworu ninhydryny oraz 0,2% acetonowego roztworu izatyny (z dodatkiem kwasu octowego) (4). Celem identyfikacji aminokwasów o zbliżonym  $R_f$  przeprowadzano rechromatografię techniką

krażkową. Ryc. 1 przedstawia chromatogram wolnych aminokwasów bulionu oraz czterech dni hodowli *B. coli* szczepu wzorcowego. Na ryc. 2 widzimy chromatogram hodowli szczepu hemolizującego nr 3594, a na ryc. 3 chromatogram wolnych aminokwasów szczepu nie hemolizującego nr 3594. Analiza chromatograficzna wykazała w podłożu obecność aminokwasów podanych w kolumnie 2 tab. 1 oraz w kolumnie 1 na ryc. 1, 2 i 3.



Ryc. 3. Chromatogram wolnych aminokwasów przesączy (od 1 do 3 dnia) hodowli *B. coli* szczepu nie hemolizującego nr 3594  
Chromatogram of free amino acids of filtrates of the culture of *B. coli* nonhemolytic strain No. 3594 (up to 5th day)

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Tab. 1 podaje wyniki dotyczące wszystkich czterech badanych szczepów *B. coli*, w kolumnie 1 podano nazwy aminokwasów, w kolumnie 2 — aminokwasy wykryte w podłożu (bulionie), w następnych są umieszczone

Tab. 1. Wolne aminokwasy podłoża i przesączy od 1 do 4 dnia hodowli *B. coli* szczepów: I wzorcowego, II hemolizującego nr 3596, III hemolizującego nr 3594, IV nie hemolizującego nr 3594  
 Free amino acids of the medium and filtrates (from 1st till 4th day) of culture of *B. coli*: I standard strain, II hemolytic strain No. 3596, III hemolytic strain No. 3594, IV nonhemolytic strain No. 3594

Aminokwas	Bulion	1 dzień hodowli				2 dzień hodowli				3 dzień hodowli				4 dzień hodowli			
		szczep				szczep				szczep				szczep			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Leucyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Izoleucyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenylalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Walina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metionina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tryptofan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kwas $\gamma$ -aminomasłowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tyrozyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Treonina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kwas glutaminowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Seryna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kwas asparaginowy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Histydyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asparagina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lizyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cystyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: + oznacza obecność aminokwasu, — oznacza brak aminokwasu

wyniki badań po 24, 48, 72 i 96 godzinach. Na uwagę zasługuje widoczne, zarówno w tab. 1, jak i na rycinach, zniknięcie, już w przesączu z pierwszego dnia hodowli, aminokwasów: kwasu asparaginowego i treoniny. Fakt ten pozwala wnioskować, że zostały one zużyte już w początkach hodowli *B. coli*. Spostrzeżenia te pokrywają się częściowo z wynikami prac przeprowadzonymi przez Abramsa R. i wsp. (1) oraz Wiame'a J. M. i Storka R. (6). Badacze ci wykazali, że pierwszym produktem asymilacji w syntezie białka jest kwas asparaginowy i kwas glutaminowy. W naszych badaniach już w pierwszym dniu zniknął kwas asparaginowy i treonina, kwas glutaminowy wprawdzie nie zniknął zupełnie, ale stężenie jego malało w sposób widoczny (patrz tab. 2 zmniejszanie się ekstynkcji). W dalszych dniach hodowli daje się zauważyć u wszystkich szczepów znikanie tryptofanu, histydyny i kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (po 48 godz.) u niektórych również lizyny.

Podobne wyniki uzyskano dla 2 szczepów hemolizujących nr 3596 i 3594. W szczepie wzorcowym (ryc. 1) różnica w zużyciu tego aminokwasu była minimalna (leżała w granicach błędu doświadczalnego), w szczepach hemolizujących (ryc. 2) zużycie było widoczne i wystąpiło od drugiego dnia hodowli. Należy zaznaczyć, że w drugim dniu hodowli szczepów hemolizujących został zsyntetyzowany aminokwas „X” odpowiadający położeniem ornitynie. W szczepie wzorcowym pojawił się on w trzecim dniu hodowli (synteza w szczepie nie hemolizującym wystąpiła najslabiej). Widoczne są również pewne zmiany stężeń pozostałych aminokwasów, największy był ubytek seryny, glicyny i  $\alpha$ -alaniny, najmniejszy tyrozyny. Spostrzeżenie to dotyczy wszystkich badanych szczepów. Zmiany stężeń poszczególnych aminokwasów ilustruje tab. 2, w której podano ekstynkcje odpowiadające stężeniom aminokwasów w poszczególnych dniach hodowli.

Opierając się na zmianie wielkości ekstynkcji, należy podkreślić, że najniższe stężenia aminokwasów zaobserwowano w trzecim dniu hodowli. Fakt ten potwierdzają ryc. 1, 2 i 3. We wszystkich szczepach zaobserwowano wzrost stężenia aminokwasów w czwartym i piątym dniu hodowli w stosunku do dnia trzeciego, jest to prawdopodobnie wynik autolizy starzejącej się hodowli.

Z tab. 2 wynika, że zapotrzebowanie na niektóre aminokwasy występowało po całkowitym wyczerpaniu najchętniej zużywanych. Z aminokwasów zużywanych w drugiej kolejności na pierwszy plan wysuwała się seryna i glicyna. Można więc sądzić, że *B. coli* nastawione jest na określone aminokwasy (kwas asparaginowy, treonina, kwas glutaminowy), a po ich wyczerpaniu zastępuje je innymi.

Tab. 2. Wartości ekstynkcji aminokwasów w poszczególnych dniach hodowli *B. coli* szczepów: I wzorcowego, II hemolizującego nr 3596, III hemolizującego nr 3594, IV nie hemolizującego nr 3594

Extinctions of amino acids in particular days of growing *B. coli* strains (standard strain, two hemolytic strains No. 3596 and No. 3594, and nonhemolytic strain No. 3594)

Aminokwas	Bulion	Pierwszy dzień hodowli szczepu				Drugi dzień hodowli szczepu				Trzeci dzień hodowli szczepu				
		3596	3594	3594	3594	3596	3594	3594	3594	3596	3594	3594	3594	
		hemo- liz. II	hemo- liz. III	hemo- nie- moliz. IV	wzor- ce I	hemo- liz. II	hemo- liz. III	hemo- nie- moliz. IV	wzor- ce I	hemo- liz. II	hemo- liz. III	hemo- nie- moliz. IV	wzor- ce I	
Leucyna	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.87	0.86	0.90	0.89	0.85	0.85	0.89	0.85	0.90
Fenylalanina	0.40	0.38	0.38	0.39	0.39	0.36	0.35	0.37	0.37	0.34	0.34	0.37	0.34	0.36
Walina	0.50	0.49	0.49	0.50	0.48	0.48	0.48	0.19	0.46	0.44	0.45	0.46	0.44	0.46
Metionina	0.28	0.26	0.25	0.26	0.24	0.23	0.23	0.23	0.22	0.21	0.22	0.21	0.21	0.21
Tryptofan	0.14	0.12	0.09	0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kwas γ-aminomasłowy	0.18	0.17	0.18	0.18	0.04	0.04	0.04	0.04	—	—	—	—	—	—
Tyrozyna	0.28	0.28	0.27	0.28	0.28	0.28	0.27	0.28	0.26	0.25	0.24	0.26	0.25	0.25
Alanina	0.50	0.50	0.50	0.50	0.43	0.41	0.40	0.47	0.41	0.40	0.39	0.41	0.40	0.44
Treonina	0.29	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kwas glutaminowy	0.40	0.18	0.19	0.21	0.19	0.18	0.18	0.20	0.16	0.11	0.10	0.16	0.11	0.12
Seryna	0.39	0.38	0.37	0.38	0.31	0.28	0.26	0.30	0.24	0.22	0.22	0.24	0.22	0.23
Glicyna	0.33	0.29	0.30	0.32	0.26	0.24	0.23	0.27	0.20	0.19	0.19	0.20	0.19	0.21
Kwas asparaginowy	0.40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginina	0.19	0.18	0.18	0.17	0.14	0.11	0.10	0.13	0.12	0.09	0.10	0.12	0.09	0.11
Histydyna	0.33	0.18	0.20	0.33	0—	—	—	0.30	—	—	—	—	—	—
Asparagina	0.25	0.22	0.23	0.23	0.23	0.22	0.19	0.18	0.18	0.18	0.16	0.18	0.18	0.15
Lizyna	0.40	0.35	—	—	0.35	—	—	—	0.35	—	—	0.35	—	—
X	—	—	—	—	—	0.30	0.32	0.29	0.25	0.06	0.05	0.25	0.06	0.09
Cystyna	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.02	0.02	0.02	—	—	—	—	—	—



Z przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników widać, że:

1) Wszystkie szczepy *B. coli* w pierwszej kolejności przyswajają kwas asparaginowy, treoninę i kwas glutaminowy.

2) U szczepów hemolizujących występuje intensywniejsze zużycie aminokwasów niż u szczepów nie hemolizujących.

3) Istnieje nieznaczna rozbieżność pomiędzy szczepami w przyswajaniu lizyny i histydyny.

4) W obrębie typu jelitowego pomiędzy poszczególnymi szczepami nie istnieją takie stałe rozbieżności w zapotrzebowaniu na dany aminokwas, które można byłoby uznać za charakterystyczne dla szczepu.

5) Wzrastające stężenie aminokwasów, występujące w czwartym i piątym dniu hodowli jest prawdopodobnie wynikiem autolizy starzejących się hodowli.

---

#### PIŚMIENNICTWO

1. Abrams R. i wsp.: J. Gen. Physiol. **32**, 271, 1941.
2. Kating H.: Arch. Microbiol. **22**, 235, 396, 1955.
3. Möller E. F.: Schwarz. Ber. Bioch. Ges. **14**, 1612, 1941.
4. Noworytko J., Sarnecka-Keller M.: Acta Bioch. Pol. **2**, 91—105, 1955.
5. Rippel A. i wsp.: Arch. Microbiol. **12**, 295, 1942.
6. Wiame I., Storck M.: Biochim. et Biophys. Acta **10**, 268, 1953.
7. Williams R. J. i Kirby H.: Science **107**, 481—483, 1948.

Pracę otrzymano 10 III 1965.

---

#### РЕЗЮМЕ

Исследовался обмен свободных аминокислот культуры *B. coli* кишечного типа — штаммов: 1) стандартного, 2) гемолизирующего № 3596, 3) гемолизирующего № 3594, 4) не гемолизирующего № 3594.

Оказалось, что: 1) все исследованные штаммы в первой очереди усваивали аспарагиновую кислоту, треонин и глютаминовую кислоту, 2) гемолизирующие штаммы обнаружили более интенсивное потребление аминокислот, нежели негемолизирующие штаммы, 3) существует незначительное расхождение между штаммами в присваивании лизина и гистидина, 4) в пределах кишечного типа между отдельными штаммами не существуют такие постоянные расхождения относительно потребности данной аминокислоты, которые можно бы считать характерными для штамма.

Рис. 1. Хроматограмма свободных аминокислот субстрата и фильтратов (от 1 до 5 дней) культуры *B. coli* стандартного штамма.

Рис. 2. Хроматограмма свободных аминокислот фильтратов (от 1 до 5 дней) культуры *B. coli* гемолизирующего штамма № 3594.

Рис. 3. Хроматограмма свободных аминокислот фильтратов (от 1 до 3 дней) культуры *B. coli* не гемолизирующего штамма № 3594.

Табл. 1. Свободные аминокислоты питательной среды и фильтратов (от 1 до 4 дней) культуры *B. coli*: I — стандартного штамма, II — гемолизирующего штамма № 3596, III — гемолизирующего штамма № 3594, IV — негемолизирующего штамма № 3594.

Табл. 2. Величина экстинкции аминокислот в отдельные дни выращивания штамма *B. coli* (стандартного штамма, двух штаммов гемолизирующих № 3596 и № 3594, а также штамма негемолизирующего № 3594).

---

## S U M M A R Y

The transformation of free amino acids of *B. coli* cultures (intestinal type) of the following strains was investigated: 1. standard strain, 2. hemolytic strain No. 3596, 3. hemolytic strain No. 3594, 4. nonhemolytic strain No. 3594. The results obtained are as follows:

1. All the strains examined assimilated, in the first place, aspartic acid, threonine and glutamic acid.
2. The assimilation of amino acids by hemolytic strains proved to be more intensive than that of nonhemolytic strains.
3. Strains differed insignificantly in assimilating lysine and histidine.
4. No rigid divergences were found between the strains of the intestinal type as far as the assimilation of a given amino acid was concerned, which could be regarded as characteristic of the strain.