

---

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*). I. Hodowla laseczki tężca, otrzymywanie przesączy i oczyszczanie materiału biologicznego**

**Исследования аминокислотного обмена жидкой десятидневной культуры палочки столбняка (*Clostridium tetani*)  
I. Культивирование палочки столбняка, получение фильтратов и очистка биологического материала**

**An Investigation of the Amino Acid Transformation of the Liquid 10-Day-Old Culture of *Clostridium tetani*.**

**I. Growing of *Clostridium tetani*, Obtaining of Filtrates and Purification of the Biological Material**

Tężec stanowi ważne i ciągle aktualne zagadnienie zarówno ze względu na ciężki przebieg choroby, wysoką śmiertelność ludzi i zwierząt, jak i z powodu na niecałkowicie wyjaśnioną patogenezę tego schorzenia. Zmiany chorobowe są ściśle związane z działaniem toksyny tężcowej, która jest ektotoksyną produkowaną przez laseczkę tężca, jako jeden z produktów jej metabolizmu. Do wytwarzania toksyny tężcowej w celach badawczych lub wytwórczych należy używać odpowiednich podłoży. Pojawiło się wiele prac poświęconych badaniom nad wpływem aminokwasów pożywki na wzrost laseczki i toksyny tężcowej (2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 i 11).

Wobec wyraźnych rozbieżności między wynikami niektórych badaczy stało się uzasadnione podjęcie badań nad tym tematem. Niniejsza praca ma na celu: przeprowadzenie metodycznego badania nad rozdziałem i identyfikacją wolnych i związanych aminokwasów podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy hodowli *Cl. tetani* zarówno na materiale otrzymanym z masowych hodowli, jak i kontrolnych posiewów własnych, przeprowadzonych w skali laboratoryjnej.

## METODA BADAŃ I MATERIAŁY

Materiały do badań stanowiły podłoża Legroux-Ramon oraz szczepy pochodzące z Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek. Przesącze otrzymywano z beztlenowych hodowli (1), prowadzonych w metalowym anaerostacie (bez bliższych danych) oraz cieplarnie zaprojektowanej i wykonanej przez Warsztaty Akademii Medycznej w Lublinie. W każdym przypadku przed analizą składu jakościowego i ilościowego aminokwasów podłoży i przesączy stosowano odbiażanie i odsalanie 96% alkoholem etylowym (8) wg własnej modyfikacji.

## BADANIA WŁASNE

## 1. Dziesięciodniowa hodowla laseczki tężca

Czynnością wstępną przed założeniem hodowli było sprawdzenie jałowości podłoża przy pomocy pożywek agarowych. Do erlenmayerki o pojemności 750 ml wprowadzano 500 ml płynnej pożywki Legroux-Ramon. Szczep laseczki tężca posiewano przy pomocy pipetki Pasteura. Otwór erlenmayerki zamykano tamponikiem z waty i gazy, wstawiano do anaerostatu o pojemności 2 l, po czym pokrywę zamykano hermetycznie przy pomocy specjalnych nakrętek. Wszystkie prace wykonywano w boksie w warunkach ścisłej jałowości.

Kolejną czynnością było wytworzenie atmosfery beztlenowej. W tym celu wypompowywano powietrze, łącząc anaerostat węzłem grubościennym z pompą próżniową. Po wypompowaniu powietrza do środka wprowadzano gaz świetlny. Następnie całe urządzenie umieszczano w cieplarni o temperaturze 37°C. Po dwu dniach anaerostat przenoszono do boksu i otwierano. Zwykle można było wyczuć nieprzyjemny zapach, który wzmagał się w miarę zaawansowania hodowli.

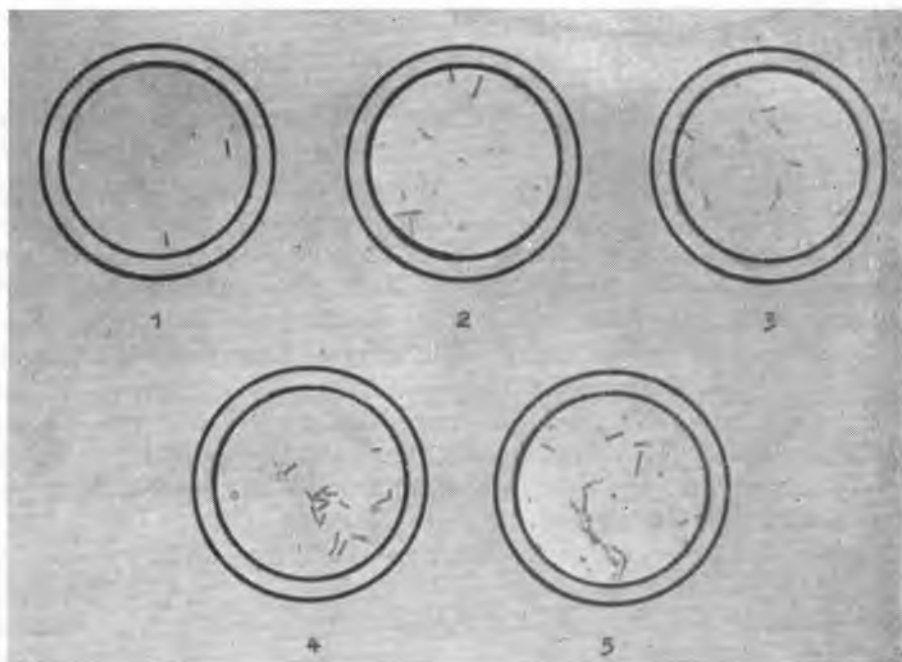
## 2. Otrzymywanie przesączy

Z otworzonej erlenmayerki pobierano 20 ml płynnej hodowli, którą natychmiast przesączało przez filtr Schotta „G5”. Po oddzieleniu masy bakteryjnej klarowny przesącz, pozbawiony laseczek tężca, zlewano do buteleczki ze szkła oranżowego zamykanej doszlifowanym korkiem i zabezpieczano fenolem (do koncentracji 0,5%) przed przerastaniem. Buteleczkę umieszczano w chłodni. Po pobraniu próbki erlenmayerkę zamykano tamponikiem gazy i waty, umieszczano w anaerostacie, wypompowywano powietrze i wprowadzano gaz świetlny. Podane czynności starano się wykonywać szybko, ażeby czas, wszystkich operacji, nie przekraczał 15 minut.

Hodowlę laseczki tężca prowadzono w ciągu 10 dni. Przy każdym pobieraniu próbki przeprowadzano mikroskopową kontrolę hodowli: 1) Na szkiełko podstawowe wprowadzano kropelkę hodowli. 2) Po całkowitym osuszeniu preparat barwiono metodą Grama. 3) Oglądano pod

mikroskopem. W wypadku gdy spostrzeżono, że hodowla jest niehomogenna i zawiera inne drobnoustroje, przerywano ją, a próbki odrzucano nawet wtedy, gdy zanieczyszczenie hodowli spostrzeżono w ostatnim, tj. 10 dniu obserwacji.

Przy tak surowej selekcji na osiem przeprowadzonych posiewów odrzucono pięć i uzyskano trzy pełne hodowle po sześć różnych próbek. Ryc. 1 przedstawia preparaty mikroskopowe jednej z serii, barwione wg Grama. Cyfry pod zdjęciami (1, 2, 4 i 5) odpowiadają kolejno: dwu-, cztero-, sześć-, ośmio- i dziesięciodniowej hodowli laseczki tężca.



Ryc. 1. Zdjęcia mikroskopowe laseczki tężca. Preparaty barwione wg Grama  
Microscopic pictures of *Clostridium tetani*. Preparations stained according to Gram

### 3. Odbiałczanie i odsalanie podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy hodowli *Cl. tetani* celem przygotowania próbek do analizy jakościowej i ilościowej aminokwasów

1 ml badanej próbki (podłoże, przesącz) przenoszono do małej szklanej parowniczkę, którą wstawiano do eksykatora wypełnionego bezwodnym  $\text{CaCl}_2$ . Po 24 godzinach (temperatura pokojowa) otrzymano suchy produkt, który następnie poddawano działaniu 5 ml 95% alkoholu etylowego.

Po 15 minutach usuwano ze ścianek parowniczkki wytrącone białko, a zawartość parowniczkki ilościowo przenoszono do próbówki wirówkowej. Oddzielenie części stałej od płynnej następowało w ciągu 10 minut przy 2.000 obrotów/min.

Alkoholowy ekstrakt wolnych aminokwasów odparowywano w parowniczkach wstawionych do eksykatora próżniowego. Po 24 godzinach suchą masę rozpuszczano w 0,5 ml wody redestylowanej. W ten sposób otrzymany roztwór nakraplano na bibułę celem przeprowadzenia chromatograficznego rozdzielania aminokwasów oraz wyciągnięcia jakościowych i ilościowych wniosków. Wyniki tych badań będą podane w następnych publikacjach.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że laseczka tężca może rozmnażać się na świeżo przygotowanych pożywkach. Przy wykonywaniu wszelkich czynności należało zachowywać bezwzględną jałowość, ponieważ hodowle w łatwy sposób ulegały zakażeniu. Z tego względu stosowano ostrą kontrolę mikroskopową (usuwano hodowle zanieczyszczone). Konserwowanie podłoży i przesączy przy pomocy 0,5% fenolu było skuteczne przez okres kilku miesięcy pod warunkiem przechowywania ich w chłodni bez dostępu światła. Stosowane odbiałczanie i odsalanie podłoży Legroux-Ramon oraz przesączy ma tę zaletę, że jest proste w wykonaniu. Wprowadzona modyfikacja osuszania próbek przed dodaniem alkoholu etylowego pozwala usunąć rozpuszczalne w wodzie peptydy, a tym samym wpłynąć korzystnie na późniejszy chromatograficzny rozdział aminokwasów.

Równocześnie z wyżej omówionym sposobem przeprowadzono próby oczyszczenia badanego materiału, używając do tego jonowymienne żywice (Dowex-50 oraz Amberlit J. R. A.-400 (4), jednak nie zauważono wyraźnych korzyści, które uzasadniałyby wprowadzenie tej metody w niniejszej pracy.

---

#### PIŚMIENNICTWO

1. Celarek J.: Zasady produkcji surowic leczniczych. Delta, Warszawa 1938, ss. 9—21, 89—98.
2. Feeney R. E., Mueller J. H., Miller P. A.: J. Bact. 46, 559—562, 1943.
3. Feeney R. E., Mueller J. H., Miller P. A.: J. Bact. 46, 563—571, 1943.
4. Gąsior E., Petruszewicz M., Kowalska H., Opieńska-Blaut J.: Acta Biochim. Pol. 5, 333—342, 1958.
5. Miller P. A., Gray C. T., Eaton M. D.: J. Bact. 79, 95—102, 1960.
6. Mueller J. H., Miller P. A.: J. Bact. 69, 271—277, 1954.
7. Mueller J. H., Miller P. A.: J. Biol. Chem. 223, 185—194, 1956.

8. Opieńska-Blauth J., Waksmundzki A., Kański M.: Chromatografia. PWN, Warszawa 1957, ss. 433—436.
9. Picket M. J.: J. Biol. Chem. **151**, 203—209, 1943.
10. Surjan M.: Z. Allgem. Pathol. und Bacteriol. **19**, 455—460, 1956.
11. Vinet G., Fredette V.: Ann. Inst. Pasteur (Paris) **94**, 530—533, 1958.

Pracę otrzymano 25 II 1965.

---

## РЕЗЮМЕ

Изучались условия, в которых можно получить фильтрат палочки столбняка в лаборатории.

Установлено, что удаление соли и белка из субстратов Legroux-Ramon, а также из фильтратов алкогольным методом не дает худших результатов, чем те, которые возникают при посредстве ионообменной смолы (Dowex — 50, а также Amberlit J.R.A. — 400).

Рис. 1. Микроскопические снимки палочки столбняка. Препараты окрашены по Граму.

---

## SUMMARY

The object of the paper was to examine the conditions under which it was possible to obtain the filtrates from the culture of *Clostridium tetani*.

It was found out that desalting and deproteinization of the Legroux-Ramon media and of the filtrates with the alcohol method was by no means less satisfactory in comparison with those obtained by means of the ion exchangeable resins (Dowex-50 and Amberlit J. R. A.-400).



