

Tadeusz Koźniewski.

Studia nad składem chemicznym
bakteryi gruźliczych oraz innych
t. zw. kwasoodpornych prątków.

(Praca nagrodzona na konkursie im. W. Koczorowskiego).

WARSZAWA

Druk. K. Kowalewskiego Piętna, 15.
1913.



www.dlibra.wum.edu.pl

Tadeusz Koźniewski.

**Studia nad składem chemicznym
bakteryi gruźliczych oraz innych
t. zw. kwasoodpornych prątków.**

(Praca nagrodzona na konkursie im. W. Koczorowskiego).

**Biblioteka Główna
WUM**

WARSZAWA

**Druk. K. Kowalewskiego Piękna, 15.
1913.**

**Biblioteka Główna
WUM
Br.6301**



000031398



www.dlibra.wum.edu.pl

Odbitka z Pamiętnka Tow. Lek. Warszaw. za r. 1913.

PAMIĘCI OJCA POŚWIĘCAM

Od roku 1889 prowadzone są liczne badania nad składem i własnościami chemicznymi bakterii gruźliczych. Wśród nich na pierwszy plan występują prace o substancji tłuszczowej, względnie woskowej, zawartej w bakteriach gruźliczych w bardzo znacznej ilości. Pierwsze ilościowe oznaczenie substancji, ulegających wytrawieniu przez wyskok i eter, wykonał w pracowni M. NENCKIEGO HAMMERSCHLAG (39). Otrzymał on liczby 26,2%—28,2% wyciągu, obliczając na suchą substancję bakterii, a więc tak znaczny procent, jakiego nie wykazywały żadne inne bakterie. Dano HAMMERSCHLAGA potwierdzone zostały przez szereg innych autorów, którzy znajdowali jeszcze wyższą zawartość owych substancji; jedni nazywali je tłuszczami, inni woskami. SCHWEINITZ i DORSET (76—80) otrzymywali do 37,41%, KLEBS (46) nie więcej niż 22%, ARONSON (2—4) 20%—25%, RUPPEL (73) 8%—26% (zależnie od wieku hodowli), KRESLING (51)—39,77% jako maximum, a przeciętnie 38,95%, BULLICH, i MACLEOD (16)—40%, BAUDRAN (10)—36%—44%, AUCLAIRE i PARIS (7)—33,82%. Liczby te, jak wi

dzimy, różnią się znacznie między sobą, a przyczyny tego są dwojakie. Przedewszystkiem, jak to SCHWEINITZ i DORSER (80) udowodnili, ilość substancji, ulegającej wytrawieniu, zależy od pochodzenia prętka gruźliczego i jadowitości szczepu; największą ilość wyciągu alkoholowo-eterowego, mianowicie: 37,41% otrzymali oni z prętków ludzkich osłabionych (mało jadowitych), następnie z końskich—31,76%, ptasich—30,65%, ludzkich jadowitych—28,03%, bydłych—26,32% świńskich—20,59%.

W liczbach tych uderza fakt, że między ludzkimi prętkami jadowitymi i osłabionymi istnieje większa różnica w zawartości ciał lipoidalnych, niż między jadowitymi ludzkimi i bydłymi oraz końskimi, które wszystkie okazywały jednakową jadowitość dla świnki morskiej. LEVENE (54—55) wykazał, że rodzaj pożywki wpływa na wzajemny stosunek wszystkich składników i to w stopniu bardzo znacznym. Hodował on bakterye gruźlicze na zwykłym bulionie glicerynowym i na tak zwanej pożywce mannitowej według PROSKAUERA i BECKA (72). Wynik analiz był następujący:

	Bakterye wyhodowane na pożywce zwykłej:	Bakterye wyhodowane na pożywce mannitowej:
Tłuszcz	31,56%	22,18%
Pozostałość po wytrawieniu:		
Popiół	5,92%	10,00%
C	55,58 „	47,41 „
H	8,46 „	7,05 „
N	9,39 „	7,91 „
S	1,39 „	0,25 „
P	0,59 „	2,67 „

Wreszcie *ceteris paribus* i wiek hodowli, t. j. czas jej trwania, odgrywa też pewną rolę. Niestety dokładniejsze badania porównawcze co do tej okoliczności nie były przeprowadzane.

Prócz powyższych istotnych czynników na wynik liczbowy przy określaniu wyciągu wpływa wybór rozpuszczalników i przyrządów. Co się tyczy rozpuszczalników obojętnych, to używano głównie wysokoku, eteru, chloroformu, a także benzolu, ksylolu, eteru naftowego i innych. HAMMERSCHLAG oraz RUPPEL do wytrawiania używali wysokoku i eteru (kolejno); SCHWEINITZ i DORSET oraz KRESLING, stosując porównawczo wyskok, eter i chloroform w rozmaitym porządku, dochodzą do wniosku, że najlepszym rozpuszczalnikiem ciał tłuszczowych, zawartych w bakterjach gruźliczych, jest chloroform; KLEBS i LEVENE oddają pierwszeństwo benzolowi, BORREL (15) ksylolowi; AUCLAIR i PARIS, FONTES (33) oraz BULLOCH i MACLEOD stosowali kolejno szereg rozpuszczalników, twierdząc, że tylko w ten sposób można osiągnąć całkowite odtłuszczenie (*degraisage complète*).

Co się tyczy przyrządów, to nie wszyscy autorzy dają w tym względzie wskazówki. FONTES używał ekstraktora SOXLETA, AUCLAIRE i PARIS—ekstraktora CHATELAINA przyczem zarówno pierwszy, jak i drudzy, umieszczali bakteryje wprost między zwitkami waty szklanej; KRESLING, BORREL, także PANZER (71) mówią o używaniu aparatu SOXLETA bez wspomnienia o gilzie; z artykułów LEVENEGO wynika, że wytrawianie bakteryi przeprowadzał pod zwrotną chłodnicą bez użycia przyrządu ekstrakcyjnego; tak samo postępował ARONSON. SCHWEINITZ i DORSET opisują dokładniej zastosowaną metodykę: używali oni ekstraktora KNORRA, ilość wytrawianych substancji oznaczali przez stratę na wadze substancji, umieszczonej w gilzie (tube).

W moich doświadczeniach wytrawianie bakteryi gruźliczych przeprowadzałem w szklanych przyrządach SOXLETA, umieszczając bakteryje w gilzie papierowej SCHLEICHERA i SCHÜLLA, do wytrawiania zaś stosowałem

wszystkie rozpuszczalniki, używane przez poprzednio wymienionych badaczy, nadto zaś zastosowałem użycie czterochlorku węglowego oraz acetonu.

Zwróciłem uwagę na to, które z nich odpowiadają warunkom doświadczenia, t. j. dobrze rozpuszczają ciała tłuszczowe oraz woskowe, zawarte w bakterjach gruźliczych, nie emulgując jednocześnie bakterii i nie porywając ich poprzez pory gilzy do kolby ekstrakcyjnej. Okazało się, że warunkom tym odpowiadają tylko wyskok etylowy oraz metylowy (wyższych nie stosowałem) i aceton. Przy użyciu wszystkich innych bakterie przeciskają się poprzez gilzę papierową i im dłużej trwa ekstrakcja, tem więcej ich ulega porwaniu do kolby ekstrakcyjnej.

Wadę tę, rzecz dziwna, wykazują zarówno rozczynniki o wysokim ciężarze gatunkowym—czterochlorek węgla, chloroform, dwusiarczek węgla, jak i rozczynniki o niskim ciężarze gatunkowym—ksylol, benzol, ligroina eter. Można to spostrzedz odrazu, obserwując płyn w rurce lewarowej, przekonać się zaś o tem można przez badanie mikroskopowe i chemiczną osadu w kolbce ekstrakcyjnej. Zupełnie nieprawidłową musi być nazwana ekstrakcja bez użycia gilzy, przez umieszczenie bakterii wprost między zwitkami waty szklanej.

Z rozpuszczalników, które tej własności względem bakterii gruźliczych nie posiadają, najlepszym okazał się aceton, gdyż na ciepło rozpuszcza on doskonale ciała lipoidalne, nie przeprowadzając wcale ciał bakteryjnych poprzez pory gilzy: płyn w kolbie ekstrakcyjnej pozostaje zupełnie przezroczystym, dopiero po pewnym czasie pojawiają się kropelki oleiste, zastygające po oziębieniu w postaci masy białej, woskowatej, jak gdyby krystalicznej.

Wyskok etylowy i metylowy dobrze wytrawiają bakterie gruźlicze tylko wtedy, jeżeli zawierają możliwie mało wody. Wytrawianie przy ich użyciu trwa znacznie dłużej i nie jest tak korzystne. Ponieważ w poprzednich pracach przedstawiano, że chloroform i ksylol są bezwa-

runkowo najlepszymi rozpuszczalnikami substancji lipoidalnych, zawartych w bakterjach gruźliczych, i że za pomocą nich można skutecznie jaknajdalej idące odtłuszczenie i odwoszczenie prątków, starałem się więc zastosować je przy użyciu wirownicy.

I ten sposób nie okazał się racjonalnym. Zawiesiny bakteryjne w chloroformie lub ksylole (także w CS_2 i CCl_4) nie dawały się przesączyć, a podczas centryfugowania bakterie zbierały się na powierzchni, tworząc gęsty kożuch. Nie mogłem znaleźć sposobu oddzielenia wyciągu chloroformowego lub ksyłolowego od samych bakterii. Musiałem dodawać znaczne ilości eteru, ażeby jako tako odcentryfugować, dokładne zaś rozdzielenie i wytrawienie skutecznie za pomocą alkoholu i acetonu, gdyż od tych płynów bakterie można z łatwością odsączyć. Jeszcze jedną niedogodność przedstawia użycie chloroformu lub ksylole:—jeżeli zawiesiny bakterii w wymienionych rozpuszczalnikach odparowywać bądź na łaźni wodnej, bądź na powietrzu, wtedy pozostałość ma konsystencję zbitą, rogowatą, nie daje się sproszkować. Trzeba ją poddać działaniu gorącego wysokoku lub acetonu, ażeby przeprowadzić w stan pozwalający na sproszkowanie i wytrawienie. Wszystkie te zabiegi były bardzo kłopotliwe.

Moja metoda wytrawiania prątków gruźliczych.

Na podstawie całego szeregu porównawczych ekstrakcji polecić mogę następującą metodę, najodpowiedniejszą zarówno dla uzyskania ciał lipoidalnych bez domieszki bakterii, jak i dla całkowitego wytrawienia prątków, czyli pozbawienia ich tych substancji, które ulegają rozpuszczeniu przez obojętne organiczne rozpuszczalniki.

Bakterie gruźlicze, otrzymane jak zwykle z hodowli na bulionie glicerynowym, przesączone od bulionu, przemywałem bardzo dokładnie dużemi ilościami wody o $t^{\circ} 80^{\circ}$

do 90°C. najprzód przez odlewanie, później na sączku płóciennym (sitko porcelanowe w lejku, — sączenie pod zmniejszonym ciśnieniem). Przemyte w ten sposób bakterye, możliwie najlepiej odciągnięte od wody, przenosiłem do kubka i zalewałem 10 — 15-oma częściami wyskoku 96%-ego i pozostawiałem je w nim przez kilka lub kilkanaście dni; po upływie tego czasu wyskok, który uległ zabarwieniu na kolor żółto-pomarańczowy, odlewałem, bakterye przenosiłem na takiż sam sączek, jak poprzedni, sączyłem z początku pod zwykłym ciśnieniem, następnie pod zmniejszonym i po dokładnem odciągnięciu znów przenosiłem bakterye do kubka i poddawałem takiemuż wytrawieniu, jak pierwszym razem. Po kilku dniach sączyłem w takiż sam sposób, przemyciałem bakterye na sączku 96% alkoholem tak długo, póki wyskok nie był bezbarwny, i silnie odciągnięte bakterye przenosiłem na miseczkę porcelanową, pozwalając im wyschnąć samoistnie na powietrzu, potem w suszarce nad chlorkiem wapniowym.

Przesącze wyskokowe sączyłem raz jeszcze na składanym sączku i odparowywałem do małej objętości w kolbce, później, gdy się zaczynały silnie pieniść, na zważonej miseczce szklanej. Po zupełnem odpędzeniu wody i wyskoku przedstawiają one masę mazistą, żółto-brunatną o wybitnym swoistym zapachu. Wytrawione w ten sposób zimnym wyskokiem bakterye przedstawiają masę sypką, hygroskopijną o odcieniu lekko żółtawym. Umieszczałem je w zważonej gilzie (SCHLEICHER i SCHÜLL) i wytrawiałem w ekstraktorze SOXLETA w zwykły sposób w ciągu 6—12 dni (a przy większych ilościach—dłużej) po 12 godzin dziennie. Już po kilkunastu godzinach w acetonie poprzednio zupełnie przezroczystym zaczynają się pojawiać krople oleiste, które przy oziębianiu zastygają w postaci białej, woskowatej, jak gdyby krystalicznej masy. Ilość owego osadu w ciągu pierwszych dni zwiększa się widocznie.

Wobec znacznej różnicy w rozpuszczalności owej substancji w acetonie zimnym a gorącym dobrze jest dla przyspieszenia wytrawiania okrywać ekstraktor i kolbkę ściereczkami i niekiedy tylko kontrolować przebieg ekstrakcji, która zresztą zawsze idzie zupełnie normalnie. Po 7 dniach daję nową kolbkę ekstrakcyjną, po 10-ciu dniach zmieniam znowu, kontrolując przez odparowanie acetonu, czy wytrawianie jest skończone.

Nasuwało się pytanie, czy tego rodzaju wytrawianie, bardzo odpowiednie do uzyskania w czystym stanie wspomnianej substancji woskowej, doprowadza jednocześnie do całkowitego odtłuszczenia i odwoszczenia, będącego celem badań tych wszystkich autorów, którzy kwestję tak zwanej kwasoodporności bakterii gruźliczych przy barwieniu Ziehl-Nelsenem stawiają w zależność od obecności ciał lipoidalnych w bakterjach gruźliczych.

W pierwszej seryi doświadczeń po skończonej ekstrakcji acetonowej suszyłem gilzę wraz z zawartemi w niej bakteriami i następnie w tym samym przyrządzie SOXLETA poddawałem ekstrakcji eterem, ligroiną, dwusiarczkiem węgla, chloroformem, czterochlorkiem węgla i ksylolem, susząc gilzę pomiędzy użyciem jednego a drugiego rozpuszczalnika. Ponieważ przy użyciu tych rozpuszczalników bakterie zawsze zostają porywane z gilzy, więc wyniku wytrawienia nie można oceniać przez stratę na wadze gilzy, lecz przez badanie zawartości kolbki ekstrakcyjnej. Osad jest w niej zawsze obecny, po odparowaniu jednak płynu można się przekonać, że składa się on wyłącznie z samych tylko bakterii: gorący aceton, ani wyskok nie wytrawiają z osadu tego żadnej rozpuszczalnej substancji, osad ten posiada skład chemiczny wytrawionych bakterii, barwi się, jak one, Ziehllem i Gramem. Wynika z tego, że bakterie gruźlicze, wytrawione według powyższego przepisu najpierw wyskokiem na zimno, później acetonem w przyrządzie SOXLETA w ciągu 6 — 12 dni (przy zachowaniu powyżej wymienionych ostrożności), mogą być uważane za wytrawione doszczętnie, t. j. za zupełnie

pozbawione substancji przechodzących do zwykłych obójnych rozpuszczalników organicznych.

Jakżeż się zachowują w ten sposób wytrawione bakterie pod względem barwienia?

Okazuje się, że barwią się one doskonale Ziehl-Nelsenem (Gramem także).

Nie udało mi się zauważyć nawet ilościowej różnicy w ich t. zw. kwasoodporności w porównaniu z bakteriami niewytrawionymi. Potwierdza to wyniki FONTESA oraz AUCLAIRA i PARISA, a także i dawniejsze w tym względzie spostrzeżenia, np. HAMMERSCHLAGA. W obrazie mikroskopowym bakterii gruźliczych, wytrawianych acetonem, spostrzegłem jednak tę różnicę, że część prątków przedstawia się cieńszymi, część zaś i to przeważająca—różańcowato ziarnistymi. Miejscami widać oddzielne ziarenka. Zarówno zcieńczone prątki, jak i ziarenka barwią się (pomimo stosowania 25% H_2SO_4 , 30% HNO_3 i t. p.) na żywo różowy lub czerwony kolor, zdolność zaś barwienia się metodą GRAMA nie tylko się nie zmniejszyła, lecz przeciwnie zwiększyła się u bakterii wytrawionych. Do tego punktu jeszcze powrócę.

Z takiego wyniku wytrawienia wypływa sam przez się wniosek, że tak zwana kwasoodporność prątków gruźliczych, t. j. własność nieodbarwiania się kwasami mineralnymi w wodnych lub wyskokowych roztworach, nie stoi w związku z obecnością w nich substancji tłuszczowych lub woskowych.

Jak wiadomo swoista własność bakterii gruźliczych, t. zw. kwasoodporność, postawiona została w związek z drugą charakterystyczną ich cechą—niezmiernie wysoką zawartością ciał tłuszczowych, względnie woskowych. Pogląd ten, wypowiedziany i uzasadniany od roku 1896 przez KOCHA (48), KLEBSA, UNNĘ (89), a szczególnie przez H. ARONSONA, tak się spopularyzował, że później zaczęto jak gdyby odwracać kierunek tej zależności i formułować sprawę tak: jeżeli bakterie gruźlicze pomimo wytrawiania nie

tracą swojej t. zw. kwasoodporności, to znaczy, że nie są „całkowicie odtłuszczone”, — że zawierają jeszcze substancje lipoidalne, które jedni, jak DEYCKE (23-27), MUCH (61-62), nazywają tłuszczami, inni jak H. ARONSON, LEVENE — woskami. ARONSON dochodzi do przekonania, że nawet za pomocą rozpuszczalników, najlepiej rozpuszczających tłuszcze, nie można osiągnąć całkowitego odwoszczenia (Entwachsung) prątków i, aby osiągnąć ten cel, używa mieszaniny 5 cz. eteru i 1 cz. wysokoku, zawierającej 1% kw. solnego. Przez dłuższe gotowanie bakteryi gruźliczych z tą mieszaniną wydobywał z nich ARONSON większe ilości substancji woskowych, niż te, które przechodziły do samego tylko wysokoku i eteru, — a jednocześnie nagle znikła u wszystkich bakteryi t. zw. kwasoodporność. Znacznie później — w r. 1910 wprowadził ARONSON (4—5) do wydalenia wosków z bakteryi gruźliczych trójchloroetylen, nazywając go pierwszym obojętnym rozpuszczalnikiem, za pomocą którego za jednym zamachem można skutecznie całkowite wydalenie substancji woskowych i pozbawić wszystkie bakterye kwasoodporności. DEYCKE i MUCH w tym samym celu stosują chlorek benzoilu, doprowadzając także do utraty t. zw. kwasoodporności. W odnośnem piśmiennictwie istnieją jeszcze następujące wzmianki o pozbawieniu kwasoodporności bakteryi rzekomo przez użycie tylko obojętnych odtłuszczających rozpuszczalników. CIACCIO (19) dowodzi, że mu się to udało; nie operował on jednak większemi masami bakteryi, lecz jedynie ilościami rozartem na szkiełku do badania mikroskopowego. BORREL ogrzewał bakterye z kwasem solnym rozcieńczonym do wrzenia, suszył i wytrawiał ksylolem, — CANTACUZÈNE (17) zaś wytrawiał wyskokiem metylowym, później ligroiną i już po 28 godzinach miał otrzymywać bakterye pozbawione t. zw. kwasoodporności, — co stoi w sprzeczności z wynikami wszystkich innych autorów.

Rozpatrując te wszystkie zabiegi z punktu widzenia chemii fizyologicznej, trzeba stanąć na stanowisku, że wytrawianiem — ekstrakcją substancji tłuszczowa-

tych (lipoidalnych) można nazywać oddzielanie ich tylko za pomocą rozpuszczalników organicznych obojętnych, t. j. takich, które ani związków lipoidalnych nie zmieniają, ani na pozostałe po wytrawieniu składniki—białka, węglowodany i. t. d., nie działają. Czyż można do nich zaliczyć mieszaninę ARONSONA, trójchloroetylen, chlorek benzoilu? czy odpowiada temu pojęciu ekstrakcja według BORRELA? Wbrew temu co pisze DEYCKE ¹⁾, chlorek benzoilu jest związkiem, który chciwie przyciąga najdrobniejsze ślady wilgoci i, rozkładając się na kwas będzwinowy i chlorowódor, działa wogóle na wszystkie substancje, zawierające grupy wodorotlenowe: jest typowym na nie odczynnikiem; również i trójchloroacetylen przy wszelkich manipulacjach niezmiernie łatwo odszczepia chlorowódor. Wszystkie te odczynniki nietylko w wyższej, ale i w pokojowej ciepłocie muszą sprowadzać głębokie zmiany w bakterjach gruźliczych.

Że zaś bakterie gruźlicze wytrawione acetonem są bardzo wrażliwe na działanie słabego kwasu solnego, przekonałem się podczas doświadczeń nad trawieniem bakterii przez pepsynę. Podczas trawienia w roztworze $\frac{1}{2}\%$ -ego kwasu bakterie ulegały niezmiernie małym zmianom. Zwiększenie ilości pepsyny prawie nie wpływało na przebieg doświadczenia, zwiększenie zaś stężenia kwasu solnego — bardzo znacznie: pewna ilość bakterii traciła t. zw. kwasoodporność, zwiększała się ilość peptonów, względnie albumoz, przechodzących do roztworu, nadto zaś roztwór redukował płyn Fehlinga. Zmiany te odbywały się dość wolno w t° 37, szybciej w t° 40 do 42°C. Z początku przypuszczałem, że występowanie odczynu redukcyjnego stoi w związku z trawieniem ciał białkowych, zawartych w bakterjach.

Równoległe doświadczenia z trawieniem trypsyną w roztworze zasadowym, przekonały mię, że tak nie jest.

¹⁾ Berl. Klin. Wochenschr. 1910 S. 1935.

Zacząłem więc badać działanie słabych kwasów na bakterye wytrawione acetonem i odrazu przekonałem się, że wystarcza krótkie gotowanie z 2^o/_o-ym kwasem solnym lub siarkowym (używałem 10-cio do 15—stokrotnej ilość kwasu), aby wszystkie bakterye straciły kwasoodporność przyczem do roztworu przechodzi znaczna ilość ciał redukujących płyn Fehlinga.

Już na zasadzie tego można było orzec, że działanie mieszaniny ARONSONA, chlorku benzoilowego lub trójchloroetyleny polega nie na jakiejś specjalnie wysokie własności rozpuszczania tłuszczów i wosków, lecz na rozszczepiającem działaniu zawartego w nich chlorowodoru. Chciałem jednak potwierdzić to jeszcze doświadczeniem ekstrakcyjnym: bakterye w ilości 7 gramów, wytrawione doszczętnie alkoholem i acetonem (jak wyżej), umieszczałem znowu w aparacie SOXLETA i wytrawiałem mieszaniną ARONSONA w ciągu dwóch dni. Wyniku ekstrakcyi nie można było określić ze straty gilzy na wadze, gdyż przy użyciu płynu powyższego, jako składającego się w ⁵/₆ częściach z eteru, bakterye przechodzą (zostają porwane) poprzez ściany gilzy do kolbki ekstrakcyjnej. Trzeba było zbadać dokładnie zawartość kolbki.

Płyn, znajdujący się w niej, przesączyłem; osad po wysuszeniu ważył 0,25 gr., miał barwę brunatną, wygląd rogowaty; dawał on odczyny ciał białkowych; ani wilgotny, ani wysuszony nie rozpuszczał się w gorącym acetonie, wysokoku absolutnym, kwasie octowym, nie zawierał więc tych ciał woskowatych, które wytrawiałem poprzednio z tychże bakteryi za pomocą acetonu. Przy barwieniu Ziehl'em osad ten przedstawia masę niebarwiącą się (odbarwiająca się), w której jednak przy bardzo starannem przeszukiwaniu można znaleźć oddzielne b. nieznaczne prątki dobrze zabarwione. Przesącz alkoholowo-eterowy odparowywałem do objętości 5—7 cm³; w tej pozostałości widać było kilka drobniutkich kropelek olejowego płynu, które po zadaniu wodą przywarły do ścian kolby. Rozpuściłem je w większej ilości eteru, przemyłem eterowy

rozczyń wodą w rozdzielaczu i odparowałem najprzód w kolbie, później na miseczce zważonej. Wążyły one 0,13 gr.

W innym doświadczeniu, do którego użyłem 28 grm. bakterii, wytrawionych specjalnie starannie acetonem (w ciągu wytrawiania bakterie były suszone, proszkowane i ponownie wytrawiane acetonem), ilość takiego oleistego płynu, uzyskanego za pomocą mieszaniny ARONSONA, wynosiła 0.11, a więc znacznie mniej.

Nie można więc powiedzieć, że po dokonaniem wytrawieniu acetonem płyn ARONSONA absolutnie nie wyciąga; można tylko powiedzieć, że są to ilości niezmiernie małe. Że rozpuszczalnik, zawierający w swym składzie kwas, wytrawia z bakterii pewną ilość substancji lipoidalnych, których nie udało się poprzednio wytrawić za pomocą rozpuszczalników obojętnych, — jest to rzeczą zupełnie naturalną.

Żadnej tkanki, czy to roślinnej, czy zwierzęcej, początkowo bogatej w tłuszcze, nie można wytrawić doszczętnie, w bezwzględnym tego słowa znaczeniu, bez uprzedniego ich strawienia, albo rozszczepienia za pomocą kwasów. Przez odpowiedni dobór i zmianę odczynników, przyrządów, suszenia i proszkowania substancji w ciągu wytrawiania można ekstrakcyę posunąć tak daleko, że w odniesieniu do obojętnych rozpuszczalników musimy ją uważać za doszczętnie wytrawioną, lecz po użyciu kwasów zawsze choć ślady substancji lipoidalnych dadzą się odnaleźć. Zresztą prawie zawsze można twierdzić, że owe drobne ilości substancji lipoidalnych, uzyskane przez dodatkową ekstrakcyę za pomocą rozpuszczalników, zawierających kwasy, są produktami wtórnymi, powstającymi przez rozkład związków więcej złożonych, wchodzących w skład protoplazmy. W danym naprz. razie substancya oleista, wytrawiona za pomocą mieszaniny ARONSONA, znacznie łatwiej rozpuszczała się w eterze i acetonie, niż substancye woskowate, wytrawione poprzednio za pomocą acetonu. Punkt topliwości jej też był niższy; ze względu na bardzo małą ilość nie mogłem zbadać dokładnie składu jej

i innych własności. Płyn wodny (5—7 cm³), odlany od owych kilku kropelek oleistych, rozcieńczony wodą do 25 cm³, redukował wybitnie płyn Fehlinga.

Wskazuje to wyraźnie na fakt, iż przy ekstrakcyi ARONSONA następuje działanie kwasu solnego takie samo, jak w roztworach wodnych, tylko powolniejsze. Bakterie, które pozostały w gilzie, nie wszystkie straciły t. zw. kwasoodporność; część, wprawdzie nieznaczna, zachowała ją. Widocznie płyn ARONSONA, działając na bakterye, umieszczone w ekstraktorze, a więc w t° znacznie niższej, niż ta, która panuje w kolbie ekstrakcyjnej, działa znacznie słabiej—powolniej. Gdy gotowałem b. gruźlicze z płynem ARONSONA wprost w kolbie pod chłodnicą, to po dwóch godzinach wszystkie bakterye traciły kwasoodporność.

Z powyższych doświadczeń nad działaniem rozcieńczonych kwasów mineralnych bądź w wodnych, bądź w alkoholowo-eterowych roztworach (zawierających jednak pewną ilość wody) wysnuwa się wniosek, że swoista własność t. zw. kwasoodporności bakteryi gruźliczych polega na obecności w nich znacznej ilości pewnej substancji, która ulega łatwo rozszczepieniu pod działaniem rozcieńczonych kwasów mineralnych na gorąco, przy czem charakterystycznymi produktami hydrolizy są cukry.

Jakaż jest bliższa natura tej substancji oraz cukru z niej powstającego?

Węglowodan bakteryi gruźliczych.

W dotychczasowym piśmiennictwie, tyczącem się składu chemicznego bakteryi gruźliczych, jest mowa o najrozmaitszych ciałach, mających tworzyć zewnętrzną ściankę (jakby otoczkę) bakteryi, względnie inkrustujących bakterye.

HAMMERSCHLAG badał działanie stężonego kwasu siarkowego na bakterye, wytrawione alkoholem i eterem i pozbawione pewnej części ciał białkowych. Otrzymał

cukry redukujące i wyciągnął wniosek, że w bakterjach gruźliczych znajduje się błonnik, którego ilość obliczył (z różnicy analiz) na 28,1%. Wkrótce później NISHIMURA, stosując metodę G. LANGEGO (stapianie z KOH) i używając do doświadczeń dużych ilości bakterii (5 — 16 gr.), przekonał się, że błonnika w nich niema, natomiast przez 5-godzinne ogrzewanie prątków z 2% kwasem siarkowym otrzymywał znaczne ilości redukującego cukru.

Już poprzednio otrzymał on tą samą drogą cukier z *bacill. prodigiosus*, *staphylococcus pyogenes* i *citreus* i z pewnej bakterii wodnej. Na podstawie tego NISHIMURA twierdzi, że wszystkie te drobnoustroje zawierają węglowodan, należący do grupy hemicelluloz.

Ruppel w r. 1899, stwierdzając wielką odporność bakterii gruźliczych na działanie rozmaitych potężnych czynników chemicznych i fizycznych, wypowiada przypuszczenie, że musi być w nich obecna chityna albo keratyna; doświadczeń odnośnych nie przedsięwzię.

HELBING w r. 1900, przez porównanie własności swojego barwienia się b. gruźliczych i jaj tasiemca, dochodzi do wniosku, że w bakterjach gruźliczych musi być obecna chityna, i t. zw. kwasoodporność od niej właśnie zależy. Żadnych innych danych, prócz tej analogii, ani doświadczeń na poparcie tego twierdzenia nie przytacza. CZAPLEWSKI podtrzymuje pogląd HELBINGA, cytując swe prace nad barwieniem skrawków z owadów według metody, stosowanej przy barwieniu bakterii gruźliczych; wspomina nadto, że pyłek widłaka, zarodniki grzybów, zrogowaciały naskórek i włosy zachowują się w ten sam sposób.

Że w bakterjach gruźliczych znajduje się chityna, stało się prawdopodobnem szczególnie od r. 1902 po zjawieniu się pracy IWANOWA, która była drugą z rzędu pracą, przynoszącą dowody chemiczne, że w rozmaitych bakterjach znajduje się chityna. Pierwszą była praca EMMERLINGA (31) o obecności chityny w *bact. xylinum*, IWANOW zaś wykrywa ją w *bacil. antracis*, *b. pyocyaneus* i *b. megatherium*, stosując następującą metodykę: odtłuszczone

bakterye zostają uwolnione od białek metodą SCHMIEDEBERGA, a nierozpuszczalną w zasadach i rozcieńczonych kwasach pozostałość, którą autor uważa za czyste błony komórkowe (*Zellmembranen*), rozpuszcza w stężonym kwasie solnym. Z płynu przesączonego otrzymuje on bądź mało zmienioną chitynę, bądź po ogrzaniu takowego—glukoza-min, który identyfikuje nie tylko przez ogólne własności fizyczno chemiczne, ale nawet i przez spalanie. Bakterye gruźliczych IWANOW nie badał, ale można się było spodziewać, że i tam chityna zostanie wykrytą.

Jednak w tym samym czasie zjawiają się prace mikroskopowe VAN-WISSELINGHA i GARBOWSKIEGO, według których przy użyciu b. sumiennej metodyki nie udało się znaleźć chityny (ani błonnika) w żadnej bakteryi; ARONSON nie znalazł w bakteryach błoniczych ani chityny, ani cellulozy.

LEVENE w bakteryach gruźliczych wykrył węglowodan, który wprost nie redukował płynu Fehlinga, łatwo jednak ulegał rozszczepieniu na cukier redukujący. Ów węglowodan jest podług niego rozpuszczalny w wodzie, daje zabarwienie brunatne z jodem, strąca się octanem ołowio-wym zasadowym, zawiera ślady azotu i fosforu; LEVENE uważa go za rodzaj glikogenu.

BENDIX w r. 1901 ogłosił swoje spostrzeżenia co do obecności pentozy w bakteryach gruźliczych. Ogrzewał je z 5% HCl na wolnym ogniu aż płyn przybrał barwę czerwoną. Przesącz dawał wybitny odczyn Trommera. BENDIX otrzymał feniloozazon o p. t. 153°—155°. Autor uważa, że ów cukier pochodzi z nukleproteidów, zawartych w bakteryach. AUCLAIR i PARIS węglowodan, zawarty w bakteryach gruźliczych, nazywają hydrocellulozą lub pseudocellulozą (?), wreszcie BAUDRAN w roku 1906 znów twierdzi, że wykrył w b. gruźliczych błonnik, rozpuszczający się w mieszaninie HCl + ZnCl₂ i dający odczyn z jodem. Ilość jego ma wynosić 3,6%—5,5%.

Wreszcie w ostatnich czasach PANZER wykrył

w bakterjach gruźliczych węglowodan, ulegający łatwo hydrolizie, który uważa za pektynę, pozatem jednak przypuszcza tam obecność chityny.

Widzimy więc, że co się tyczy węglowodanu, istniejącego w b. gruźliczych, wypowiedano najrozmaitsze poglądy.

Moje doświadczenia dały wyniki zgodne z wynikami NISHIMURY, mianowicie, że w bakterjach gruźliczych znajduje się ciało, roszczepiające się pod wpływem działania słabych kwasów na cukier. Badanie tej kwestyi starałem się poprowadzić dalej, mianowicie: 1° określić bliżej naturę owego cukru, ewentualnie wyosobnić go, 2° poznać, względnie otrzymać macierzystą substancję, t.j. ten związek złożony, z którego odszczepia się cukier.

Przedewszystkiem zaś określałem metodą BANGA ilość otrzymywanego z bakteryi cukru.—Z 0,5 gr. wytrawionych acetonem bakteryi wynosiła ona w rozmaitych doświadczeniach: a) 151,5 mlg., b) 135 mlg., c) 148 mlg., co odpowiadało 27%—30%. Przy przerabianiu jednak większych ilości bakteryi (kilkunastu gramów) otrzymywałem znacznie gorszą wydajność (poniżej 15%).

Co się tyczy własności optycznych tego cukru, to natrafiłem tutaj na fakt oryginalny. Roztwory, otrzymywane przez hydrolizę bakteryi 2‰—3‰ kwasem siarkowym, nie skręcają płaszczyzny spolaryzowanego światła nawet wtedy, gdy zawierają do 2‰ cukru. Było to dla mnie taką niespodzianką, że zanim zdążyłem zrobić próbę fermentacyjną, powstała we mnie wątpliwość, czy ciało, redukujące płyn FEHLINGA lub BANGA, jest istotnie cukrem. Pomimo używania do hydrolizy b. słabego kwasu obawiałem się, czy nie są to pochodne purynowe. Poszukiwanie ich wypadło ujemnie.

Próba drożdżowa zaś usunęła wątpliwość. Płyny te fermentują bardzo szybko, a pozostałość skręca płaszczyznę spolaryzowanego światła nalewo i to silnie; oznaczenie cukru metodą Banga przed fermentacją i po fermentacji

wykazuje, że rozkładowi na bezwodnik węglowy i wyskok ulega nieco mniej, niż połowa pierwotnej ilości cukru. Tego rodzaju wynik otrzymywałem parę razy, niekiedy jednak, po dłuższem ogrzewaniu bakteryi z kwasem siarkowym lub po użyciu większego, ponad 5% stężenia kwasu, nie otrzymywałem płynu zupełnie obojętnego pod względem optycznym, lecz płyn, skręcający płaszczyznę spolaryzowanego światła słabo nalewo. Jednocześnie płyny takie wykazywały odczyn biuretowy. Trudność polega na takim poprowadzeniu hydrolizy, aby odszczepiła się możliwie duża ilość węglowodanu, a ciała białkowe pozostały nienaruszone. Jestem w toku opracowywania szczegółów takiej metodyki. Próba fenyloozazonowa wypadła dodatnio, wydajność jednak jest bardzo małą, tak iż wystarczyła mi do jednokrotnego tylko przekrystalizowania. P. t. 168—170°.

Co się tyczy natury substancyi, będącej macierzystą dla owych cukrów, redukujących płyn Fehlinga, to pewne moje doświadczenia zdają się wskazywać, że jest to węglowodan złożony, należący do grupy hemicelluloz. Bakterye gruźlicze (wytrawione, jak zawsze, acetonem) ogrzewałem w autoklawie do 170° z 10-krotną ilością wody, następnie sączyłem, przemywałem wodą gorącą i przesącze odparowywałem. Pozostałość przedstawia się w postaci masy podobnej do dekstryny, która przy ponownem rozpuszczaniu w wodzie daje roztwory opalizujące. Roztwory wodne 1/2%—1% nie skręcają płaszczyzny spolaryzowanego światła, w bardziej zaś stężonych roztworach nie można robić pomiarów, gdyż nie przepuszczają dostatecznie światła. Z wodnych roztworów wspomniana substancja strąca się za pomocą wysokoku i zasadowego octanu ołowiowego, wodne roztwory owego ciała nie redukują płynu Fehlinga, czynią to natomiast po uprzedniem gotowaniu z kwasami mineralnymi. Produkt hydrolizy również nie skręca płaszczyzny spolaryzowanego światła, jeden ze składników zaś ulega fermentacyi. Z powodu braku materiału nie mogłem na razie zrobić analizy elementarnej substancyi powyższej.

Przez gotowanie z wodą bakterii pozostałych na sączku można wytrawić dalsze ilości owego ciekawego węglowodanu. Jednak tą drogą nie mogłem wydalić z bakterii całej ilości węglowodanów, gdyż pozostałość po takim ogrzewaniu w autoklawie i dokładnem przemyciu wodą gorącą dawała przy hydrolizie kwasami jeszcze wydatne ilości redukującego cukru.

Produkt, powyżej opisany, posiada własności charakterystyczne dla hemicelluloz, w tej formie nie występuje jednak w bakterjach gruźliczych, lecz w formie nierozpuszczalnej.

Naturalnie, że tylko przez przeprowadzenie go w modyfikację rozpuszczalną możemy go oddzielić od ciał bakterieryjnych i otrzymać w postaci dostępnej do badania chemicznego.

Pewne dane uprawniają do przypuszczenia, że nietylko przez ogrzewanie w autoklawie pod ciśnieniem, ale także i przez ostrożne działanie bardzo rozcieńczonymi kwasami można otrzymać ową hemicellulozę. Przy takiej ostrożnej hydrolizie otrzymujemy roztwory, które po zobojętnieniu kwasu dają obfity osad z wyskokiem. Osad ten zawiera zmienne ilości wapnia; wytrącanie kw. siarkow. należy prowadzić przy starannem unikaniu nadmiaru CaCO_3 . Póki nie będę miał większych ilości owego ciała, nie mogę twierdzić, że macierzystą substancją owych cukrów jest polisacharyd, a nie ciało zawierające inne jeszcze grupy. Na korzyść pierwszego poglądu przemawiają nietylko ogólne własności owej dekstrynowatej substancji, ale i bardzo znaczny procent wytwarzanych cukrów, łatwość, z jaką zachodzi hydroliza, brak wśród produktów hydrolizy ciał peptonowych oraz zasad purynowych.

Co się tyczy działania stężonego kwasu solnego na bakterie gruźlicze wytrawione acetonem, to na przebieg takiego ma znaczny wpływ ciepłota. Jeżeli kwas solny działa w $t^\circ 10-12^\circ\text{C}$, to nawet po kilkunastu godzinach zabarwia się tylko na czerwono-fioletowy kolor i po przesączeniu redukuje płyn Fehlinga; przy badaniu mikrosko-

powem (Ziehl-Nels.) znajdujemy, że część prątków straciła t. zw. kwasoodporność, część jednak pozostaje zabarwioną.

Jeżeli zostawiamy bakterye w kwasie solnym stężonym przy t° 25—30°, wtedy po kilkunastu godzinach cała masa ciemnieje silnie i przesącz redukuje płyn Fehlinga stosunkowo słabiej; jeżeli zaś ogrzewać bakterye z kwasem solnym na łaźni, wtedy czernieją one zupełnie, a brunatno-czarny przesącz nie redukuje płynu Fehlinga ani wprost, ani po zdyalizowaniu. Dyalizat, poddany powolnemu odparowaniu, nie wydziela ani śladu utworów krystalicznych, słowem przy użyciu zwykłego przepisu WINTERSTEINA glukozy otrzymane z bakteryi gruzliczych nie można, a więc nie zawierają one chityny, wbrew przypuszczeniom HELBINGA i innych.

Ilość i własności wyciągu alkoholowego.

Równoległe z badaniem węglowodanów bakteryi gruzliczych prowadziłem badanie substancyi wytrawionych z nich za pomocą alkoholu i acetonu. Powyższa metoda ekstrakcy — w dwóch okresach — przedstawia tę dogodność, że ciała lipoidalne zawarte w b. gruzliczych zostają odrazu rozdzielone na dwie części; jedna z nich (wyciąg alkoholowy) przedstawia mieszaninę rozmaitych związków chemicznych: kwasów tłuszczowych, małych ilości lecytyn, barwnika żółtego, substancyi wonnych i innych; druga część (wyciąg acetonowy) składa się przeważnie z owego białego ciała, dającego się łatwo oczyścić.

Ilość wyciągu alkoholowego przy zachowaniu podanych przepisów bywa niewielką: 2%—3,5%. Może jednak dochodzić i do 6%—7%. Zależy to od ilości wysokoku, użytego do wytrawienia danej ilości bakteryi; do alkoholowego wyciągu bowiem przechodzą prócz wymienionych powyżej składników także pewne ilości owego ciała, którego główna ilość ulega wytrawieniu dopiero przez gorący aceton. Owe ciało, o ile jest już oczyszczone, rozpuszcza się w zimnym wysokoku bardzo mało, w obecności jednak wolnych kwasów tłuszczowych oraz lecytyny przechodzi ono

no alkoholowego wyciągu w ilościach epokaźniejszych. W tem leży przyczyna, że skład, a więc i ilość alkoholowego wyciągu jest różną, zależnie od tego, czy użyjemy więcej, czy mniej wysokoku do wytrawiania danej ilości bakteryi, oraz czy rozdzielimy przy wytrawianiu ten wyskok na 2, czy więcej porcyi. Jeżeli otrzymamy stosunkowo nizki odsetek wyciągu alkoholowego, — znaczy to, że składnik wyciągu acetonowego jest w nim słabo reprezentowany. Konsystencya wyciągu jest w tym wypadku mazistą, liczby—kwasowa, zmydlenia, jodowa—wysokie. Natomiast wyciąg alkoholowy jest tem stalszy i jaśniejszy, a liczby jego odpowiednio niższe, im więcej ciała należącego do wyciągu acetonowego przejdzie do wyciągu alkoholowego. Jako przykład ilustrujący przytoczę dane następujące:

275 gr. surowego materiału, tj. hodowli, pochodzących z instytutu Pasteurowskiego w Paryżu, rozdzieliłem na dwie porcy: 200 gr. i 75 gr. Hodowle powyższe zawierały dużo gliceryny i wody, mianowicie 67,89%, tak iż suchej substancyi było w całej tej ilości 88,3 gr. Każdą z tych dwóch porcyi przemywałem jak zwykle wodą gorącą i wytrawiałem oddzielnie za pomocą równych części zimnego wysokoku. Wyciąg alkoholowy z porcyi 200-gramowej wyniósł 1,7 gr., z porcyi 75-gramowej—1,6 gr., a więc cokolwiek tylko mniej. Procentowo wynosi to 2,65% oraz 6,64%. Dokładne dane, tyżące się składu chemicznego wyciągu alkoholowego, podam w dalszej części pracy niniejszej

Ilość wyciągu acetonowego.

Co się tyczy wyciągu acetonowego, to ilość jego, oznaczana przez stratę na wadze, zwykle wynosiła od 20% do 24%. W jednym z doświadczeń, w którym przerobiłem na raz większą ilość bakteryi, mianowicie 275 gr. surowego produktu, co odpowiadało 88,3 gr. suchej substancyi, ilość wyciągu acetonowego wynosiła 18,88 gr., a więc

21,38%. Ponieważ procent wyciągu alkoholowego wynosił w temże doświadczeniu 3,74%, więc summa wszystkich wytrawionych substancji (przez wyskok + przez aceton) wynosiła 25,12%.

SCHWEINITZ i DORSET z bakterii gruźliczych otrzymywali nieco więcej, mianowicie 30,65%, z bakterii typu bydłęcego zaś 26,32%, ja znów z prątków bydłęcych¹⁾ otrzymywałem 28,3% - 30%. Zresztą z prac wymienionych uczonych amerykańskich wiemy, że rozmaite czynniki hodowlane wpływają na ilość wyciągu.

Skład chemiczny wyciągu acetonowego.

I. Jak już wspomniałem, podczas ekstrakcji acetonowej wydziela się z acetonu produkt zastygający w postaci białej masy.

Masa ta odsusza się z łatwością, wysycha szybko i można ją dalej oczyszczać przez rozpuszczanie w gorącym bezwodnym wyskoku etylowym, z którego po oziębieniu wydziela się w postaci napozór krystalicznej; osad ten badany pod mikroskopem przedstawia się w postaci tworów, mających postać zbliżoną do sferokryształów, nie wykazujących jednak wyraźnej struktury krystalicznej. Oczyszczone w sposób powyższy ciało zaczyna się topić przy 42°, całkowite stopienie następuje w t° 49° — 51°. W ciepłocie pokojowej można go dobrze ucierać na delikatny, idealnie biały proszek, nie przyciągający wilgoci.

Na zimno rozpuszcza się w chloroformie i ligroinie wyżej wrzącej (ponad 80°). W stężonych kwasach mineralnych nie rozpuszcza się, kwasu siarkowego nie zabarwia wcale, w KOH—*alcoholicum* na zimno nie rozpuszcza

¹⁾ Prątki powyższe otrzymałem z Zakładu Mikrobiologii Uniw. Jagiellońskiego dzięki uprzejmości dyrektora prof. dr. J. NOWAKA; pochodziły z hodowli 3—4-miesięcznej.

się prawie wcale, na gorąco zaś—po długiem gotowaniu bezpośrednio na palniku, ulega zmydleniu,—jeżeli KOH zostało rozpuszczone w wysoku możliwie zbliżonym do absolutnego. Najwyższa liczba zmydlenia, jaką otrzymałem, była 125,2. Przebieg jednak zmydlenia pozwala mi przypuszczać, że nie jest to jeszcze właściwa całkowita liczba zmydlenia, że przy zwiększaniu ilości KOH—*alcoholicum*, oraz przy zastosowaniu metody HENRIQUEZA zmydlenia wosków otrzymam liczbę wyższą. Po nieco krótszem ogrzewaniu albo po użyciu roztworów KOH z wysokiem 99% albo 98^o/_o-ym otrzymywałem liczbę zmydlenia 118,2—117,1 a raz nawet 103. Jest to ciało, ulegające zmydleniu trudniej, niż wosk pszczeli i olbrot (*cetaceum*). Liczba jodowa jego jest bardzo niska. Najwyższa, jaką otrzymałem, była 9,92. Roztwory acetonowe i chloroformowe powyższego ciała nie skręcają płaszczyzny spolaryzowanego światła.

Pomimo, iż opisane ciało pod względem zachowania się względem rozpuszczalników robi wrażenie iudywiduum chemicznego, analizy elementarne dotychczas nie dają ustalonych wartości.

Pierwotne analizy produktu, czyszczonego bardzo starannie za pomocą acetonu i wysoku, zawierającego jednak bardzo drobne ilości ciał nieorganicznych, dały mi wynik następujący.

Analiza.

Przy spalaniu na łódeczce platynowej w strumieniu tlenowym 0,2184 gr. subst. dało 0,2594 gr. H₂O i 0,6196 gr. CO₂.

Znaleziono:

Obliczono:

według wzoru C₁₂H₂₄O (C₂₄H₄₈O₂)

C% = 77,37

C% = 78,17

H% = 13,31

H% = 13,14

Produkt powyższy w celu uwolnienia go od substancji nieorganicznych przemywałem wodą zakwaszoną kwa-

sem HCl, następnie wodą przekroploną na gorąco i znów rozpuszczałem w gorącym wyskoku.

W ten sposób oczyszczone ciało dawało przy analizie wyższą zawartość węgla, a niższą wodoru.

Analiza.

0,1575 gr. subst. dało 0,1786 gr. H₂O i 0,4550 gr. CO₂

Znaleziono:	Obliczono:
	według wzoru C ₂₅ H ₄₈ O ₂
C% = 78,79	C% = 78,86
H% = 12,71	H% = 12,72

Inne analizy dawały jeszcze nieco wyższą zawartość węgla — do 79,2%. Jest rzeczą wiadomą, jak trudne jest oczyszczenie ciała o naturze tłuszczowej lub woskowej od drobnych nawet przymieszek.

W danym razie trzeba będzie przeprowadzić badane ciało wielokrotnie przez wyskok, za każdym razem robiąc analizę elementarną poszczególnych frakcyi. Nadto trzeba będzie wyosobnić produkty zmydlenia — (kwas i alkohol) i takowe zanalizować.

W każdym razie dotychczasowe analizy i wyniki zmydlenia pozwalają na wypowiedzenie zdania, że badane ciało, stanowiące przeważający składnik wśród związków lipoidalnych, wytwarzanych przez prątki gruźlicze, należy do rzędu niższych wosków, czyli jest estrem, trudno bardzo ulegającym zmydleniu.

Jeżeliby we wzorze przytoczonym dla porównania z rezultatami pierwszej analizy — C₂₄H₄₈O₂ przyjąć, że odpowiednim kwasem jest kwas o wzorze C₁₂H₂₄O₂ (kw. lau-rynowy), a alkoholem — C₁₂H₂₆O (alk. dodecyłowy), w takim razie liczba zmydlenia odpowiedniego estru równałaby się 152,3. Ja zaś otrzymałem jako najwyższą liczbę zmydlenia 125,3; ale nawet przy ocenianiu tego zmydlenia prócz hydrolizy przypuszczalnego estru trzeba mieć na uwadze także możliwość inną: po długim gotowaniu z wo-

dzianem potasowym w absolutnym alkoholu także inny związek chemiczny, np. alkohol lub lakton może uleść rozkładowi na produkty kwasowe, wiążące zasady. Przeciw laktonowej naturze danego ciała przemawia trudna rozpuszczalność w KOH—*alcoholicum*, przeciw temu, że dane ciało jest alkoholem, przemawia doświadczenie z acetylacją. Po bardzo długim gotowaniu z bezwodnikiem octowym i octanem sodowym stopionym otrzymałem produkt, nie różniący się własnościami ogólnymi od pierwszego produktu, a liczba zmydlenia była tylko nieco wyższa: 131,1. Wszystko to przemawia za poglądem, że badane ciało jest estrem. Dalsze badania są w toku.

II. Drugim składnikiem wyciągu acetonowego prątków gruźliczych jest ciało znacznie łatwiej rozpuszczalne w acetonie i pozostające po wydzieleniu się głównego składnika wyciągu acetonowego (powyżej opisanego) w roztworze acetonowym.

Po odparowaniu acetonu przedstawia się w postaci żółtej masy oleistej, łatwo rozpuszczalnej w eterze. Liczba zmydlenia powyższej substancji=170. Ilość jej jest niewielka. Substancja ta jest przedmiotem dalszych badań.

Badanie innych t. zw. kwasoodpornych prątków.

Równoległe z badaniem składu chemicznego bakterii gruźliczych prowadziłem badanie nad składem chemicznym pewnych drobnoustrojów, zaliczających się do tej samej grupy t. zw. kwasoodpornych prątków. Do badania wybrałem narazie te prątki, które należą do lepiej poznanych i które najczęściej były zestawiane z prątkami gruźliczemi pod względem biologicznym, a więc prątek z moczku (*Harnbacillus*), prątek tymotejkowy (*Thimoteenbacillus*) i prątek gruźlicy padalcowej (*Blindschleichtuberculosebacillus*).

Prątki te hodowałem*) na bulionie glicerynowym, zawierającym 5% gliceryny, 1% peptonu i 0,5% NaCl. Prątki moczowy i tymotejkowy wyrastały w cieplarni bardzo szybko, dając po 3 tygodn. hodowle niezmiernie obfite, które później rosły już coraz wolniej. Prątek gruźlicy padalcowej, wstawiony od razu po zaszczepieniu do cieplarki, nie chciał rosnąć. Dopiero po kilku—lub kilkunastodniowym stanie w t° pokojowej zjawiała się na powierzchni bulionu cienka błonka. Po pewnym czasie (3—4-ch tygodniach) hodowle były wstawione do cieplarki, gdzie rosły dość szybko i obficie.

Po 3-ch miesiącach poddawałem je sterylizacji. Jednak wydajność z tej samej ilości bulionu była 2 razy mniejsza, niż z kultur prątka moczowego lub tymotejkowego, hodowanego tylko 6 tygodni.

Badanie chemiczne wymienionych prątków prowadziłem ściśle według metody w opracowanej dla prątków gruźliczych, t. j. przemywałem je wodą, następnie wytrawiałem za pomocą wysokoku na zimno, wreszcie gorącym acetonem w przyrządzie SOXLETA. Następnie badałem oddzielnie wyciągi alkoholowe, acetonowe, wreszcie wytrawione prątki.

Przerabiałem zwykle materiały z 20 kolb, zawierających łącznie 5 litrów pożywki; zbiór wynosił—28 gr. (obliczając na suchą substancję) prątka moczowego, 30 gr. prątka tymotejkowego, 16 gr. prątka gruźlicy padalcowej.

Ogólny rezultat badań, których dokładne wyniki liczbowe przedstawię później, był następujący: skład chemiczny wymienionych prątków jest zbliżony do składu chemicznego prątków gruźliczych; pod względem ilości poszczególnych składników różnice są jednak bardzo znaczne, a i pod względem jakościowym pewne składniki są odmienne.

Ogólne podobieństwo polega na obecności w wymienionych prątkach znacznych ilości substancji lipoidalnych, oraz charakterystycznego węglowodanu—hemicellulozy.

*) P. A. Macieszy, asystentowi zakładu Patologii ogólnej Uniw. Jagiell., składam serdeczne podziękowanie za przeszczepianie powyższych prątków.

W prątku moczowym ilość ciał tłuszczowatych i woskowatych, wytrawialnych wyskokiem i acetonem, wynosiła 28,24%, w prątku tymotejkowym 21,27%, w prątku gruźlicy padalcowej 26,45%,—a więc w granicach jak u prątków gruźliczych rozmaitego pochodzenia. Stosunek liczbowy między wyciągiem wyskokowym i wyciągiem acetonowym jest bardzo różny. Wyciąg wyskokowy z prątką moczowego wynosi 4,68%, z prątką tymotejkowego 5,30%, a więc podobnie jak u prątką gruźliczego; aceton wytrawia następnie z prątką moczowego 23,56%, z prątką tymotejkowego 16%—a więc ilości znaczne. Substancje lipoidalne prątką gruźlicy padalcowej pod względem rozpuszczalności zachowują się wręcz odmiennie: wyskok wytrawia z nich aż 19,16%, a aceton już tylko 7,29%. Już z tego zachowania się wnosić można o odmiennym składzie chemicznym substancji lipoidalnych u tej bakterji. Badanie dokładne obu wyciągów—wyskokowego i acetonowego, potwierdza to w zupełności.

Zanim przedstawię dokładne liczby, zaznaczę przede wszystkim, że z wyciągu acetonowego prątków moczowego i tymotejkowego wyosobniłem ciało woskowane zupełnie podobne do tego ciała, które stanowi główny składnik wyciągu acetonowego prątków gruźliczych. Zarówno jednak u prątką moczowego, jak i u prątką tymotejkowego owo ciało woskowane nie jest już przeważającym składnikiem. U prątką moczowego stanowi ono w każdym razie więcej, niż 60% całego wyciągu acetonowego, u prątką tymotejkowego—mniej niż 40%. Natomiast drugi składnik wyciągu acetonowego, owo ciało oleiste, łatwo rozpuszczalne w eterze i zimnym acetonie występuje w pokaźnej ilości.

Z prątką gruźlicy padalcowej owego ciała woskowanego wyosobnić nie mogłem.

Widzimy więc, że z wymienionych prątków najwięcej do bakterji gruźliczej zbliżony jest pod względem składu chemicznego składników lipoidalnych prątek moczowy,—po nim następuje prątek tymotejkowy, zaś prątek gruźlicy padalcowej różni się b. znacznie.

Co się tyczy własności t. zw. kwasoodporności wymienionych prątków, to na podstawie dotychczasowych badań mogę powiedzieć, że polega ona, podobnie jak u bakterii gruźliczych, na swoistej własności węglowodanu—hemicellulozy, zawartej w dużej ilości we wszystkich trzech prątkach. Wszystkie wytrawione doszczętnie według, mojej metody nie odbarwiają się przy barwieniu Ziehl-Nelsenem. Dopiero po ogrzaniu ze słabymi kwasami mineralnymi tracą swą kwasoodporność, przyczem do roztworu przechodzą cukry redukujące płyn FEHLINGA lub BANGA.

O naturze tych cukrów wkrótce zdam szczegółową sprawę.

Studia powyższe uskuteczniłem nad materiałem otrzymanym w ilości znacznej, umożliwiającą badania chemiczne, od p. Jana Danysza z pracowni tuberkulinowej instytutu Pasteurowskiego w Paryżu. Dziękuję niniejszem dyrekcji Instytutu, kierownikowi pracowni tuberkulinowej, szczególnie zaś serdecznie dziękuję p. J. Danyszowi za cenny materiał, jak również za udzielenie mi miejsca w pracowni oraz wszelkiej pomocy w pracy.

KRAKOW.

*Zakład farmakologiczno-farmakognostyczny
Uniwersytetu Jagiellońskiego*

PIŚMIENNICTWO *).

- 1) Alilaire. C. R. Ac. des Sciences 1907. 9 décembre p. 1215.
- 2) Aronson Hans. Berlin. klin. Wochenschr. 1898, S. 484.

*) Spisem tym obejmuję wszystkie napotkane prace, odnoszące się do chemii bakterii gruźliczych, prócz tego także pewne prace i przyczynki, odnoszące się wogóle do chemii bakteryjnej, a mające według mego zdania znaczenie ogólniejsze.

- 3) Aronson Hans. Berlin. klin. Wochenschr. 1902, S. 651.
- 4) Aronson Hans. Berlin. klin. Wochenschr. 1910, S. 1617.
- 5) Aronson Hans. Berlin. klin. Wochenschr. 1910, S. 2022.
- 6) Aronson Hans. Archiv. für Kinderheilk. 1900, Bd. 30, S. 23.
- 7) Auclair et Paris. C. R. Acad. des Sciences 1907, p. 278 vel Arch. de la médec. expér. 1907, T. 19, p. 129.
- 8) Auclair et Paris. Arch. de la médec. expér. 1908, T. 20, Nr. 6.
- 9) Auclair. Étude expérimentale sur les poisons du bac. tuberc. humain. Thèse 1898 Paris.
- 10) Baudran. C. R. Ac. des Sciences 1906, T. 142, p. 657.
- 11) " C. R. Ac. des Sciences 1909, p. 875.
- 12) " " " 1910, p. 1200.
- 13) Bendix. Deutsche med. Woch. 1901, S. 18.
- 14) Borissjak, Sieber u. Metalnikoff. Z. für Immunitätsforsch. 1912, Bd. XII, Origin., S. 65.
- 15) Borrel. Bull. de l'Inst. Pasteur 1904, T. 2, p. 409.
- 16) Bulloch u. Macleod. Journ. of Hyg. 1904, Vol. 4.
- 17) Cantacuzène. Ann. Inst. Past. 1905, p. 699.
- 18) Carrière. C. R. Soc. Biol. 1901, p. 1089.
- 19) Ciaccio. " " " 1906.
- 20) Citron. Centralbl. f. Bakt. 1910, Bd. 47, S. 503.
- 21) Cramer. Arch. f. Hyg. 1893, S. 151.
- 22) Czaplowski. Z. f. wissenschaftliche Mikroskopie 1901, Bd. 18, S. 97.
- 23) Deycke Pascha u. Reschad Bey. Deutsch. med. Wochenschr. 1905, S. 489, 545.
- 24) Deycke Pascha u. Reschad Bey. Deutsch. med. Wochenschr. 1907, S. 89.
- 25) Deycke u. Much. Müuch. med. Wochenschr. 1909, Nr. 39.
- 26) Deycke u. Much. Berlin. klin. Wochenschr. 1910, S. 1933.
- 27) Deycke. Münch. med. Woch. 1910, S. 663.
- 28) Dorset u. Emery. Centralbl. f. Bakt. 1906, Bd. 37, S. 363.

- 29) D r e y f u s s. Z. f. Physiol. Ch. 1894, Bd. 18, S. 358.
- 30) D z i e r z g o w s k i i R e k o w s k i 1892. Nowiny Lekarskie Nr. 6, 7, oraz Arch. d. Sciences biolog. T. I. p. 167.
- 31) E m m e r l i n g. Ber. chem. Ges. 1899, Bd. 32, S. 541.
- 32) P l e i s c h e r. Wratsch 1911, Nr. 16.
- 33) F o n t e s. Centr. f. Bakt. 1909, Bd. 49, S. 317.
- 34) F r e u n d. Jahrb. der Ges. Wiener Ärzte 1886. Bd. 28.
- 35) G a l e o t t i. Z. f. physiol. Chemie. 1898, Bd. 25, S. 48.
- 36) G a r b o w s k i. Centr. f. Bakt. II, Abt., 1908, Bd. 20, S. 109.
- 37) d e G i a x a. Centr. f. Bakt. 1900, Bd. 30, S. 670
- 38) G r i m m e. Centr. f. Bakt. 1903, Bd. 32, S. 165.
- 39) H a m m e r s c h l a g. Sitzungsber. Wien. Akad. 1889, Bd. 97 (II b.) S. 986 vel Monatshefte für Chemie. 1889, S. 9.
- 40) H a m m e r s c h l a g. Centralbl. f. Klinische Med. 1891, S. 9.
- 41) H a t a n o. Beiträge z. klin. d. Tuberculose. 1910, Bd. XVI. Heft. 1.
- 42) H e l b i n g. Deutsche med. Woch. 1900, S. 133.
- 43) v. H o f f m a n n. Wien. klin. Woch. 1894, S. 712.
- 44) I w a n o f f, Hofmeisters Beiträge. 1902, Bd. I, S. 524.
- 45) K a p p e s. Arch. für Hyg. 1893, S. 155.
- 46) K l e b s. Centr. f. Bakt. 1896, Bd. 20, S. 499.
- 47) K o c h. Deutsche med. Wochenschr. 1891, S. 1189,
- 48) " " " " " 1897, S. 209.
- 49) K o n s t a n t i n o w i t s c h. Z. f. Hygiene 1909, Bd. 63, S. 224.
- 50) K o ź n i e w s k i. Rocznik lekarski 1912, T. II, Nr. 3, Kraków.
- 51) K r e s l i n g. Centralbl. f. Bakt. 1901, Bd. 30. S. 897.
- 52) K ü h n e. Z. f. Biologie 1893, Bd. 30, S. 221.
- 53) K u t s c h e r. Sitzber. Gesellsch. Beförd. d. Naturwiss. Marburg 1910.
- 54) L e v e n e. Journ. of med. Research. Boston. 1901 Vol. VI, p. 135.

- 55) L e v e n e. Journ. of med. Research. Boston. 1904 Vol. XII, p. 251.
- 56) L i e b e r m e i s t e r. Deutsche med. Woch. 1909, S. 1224.
- 57) L o n d o n u. R i w k i n d. Z. f. physiol. Ch. 1908, Bd. 56, S. 550.
- 58) M a r p m a n. Centralbl. f. Bakt. 1897, Bd. 22, S. 582.
- 59) M e t a l n i k o f f. Centralbl. f. Bakt. 1906, Bd. 41, S. 54, 188, 391.
- 60) M o u s s u e t G o u p i l. C. R. Ac. des Sciences 1907, p. 1231.
- 61) M u c h. München. med. Woch. 1909, Nr. 36.
- 62) " " " " " 1911, S. 597.
- 63) M ü c h u n d " L e s c h k e. Beiträge zur Klinik der Tuberkulose. 1911, Bd. XX, Heft. 3.
- 64) M u t e r m i l c h. C.R.Soc.biol. 1908, t. 65, p. 359.
- 65) N e n c k i. Gazeta lekarska 1884, Nr. 34 vel. Ber. d. deutsch. ch. Ges. Bd. 17, s. 2605.
- 66) N e n c k i u. S c h a f f e r. Journ. f. prakt. Chemie 1881 Bd. 20, S. 443.
- 67) N i c o l l e e t A l i l a i r e. Ann. Inst. Pasteur. 1909, T. 23, p. 547.
- 68) v. N i e s e n. Centralbl. f. Bakt. 1903, Bd. 32, S. 671.
- 69) N i s h i m u r a. Arch. f. Hyg. 1893, Bd. 18, S. 318.
- 70) " " " " " 1894, Bd. 21, S. 52.
- 71) P a n z e r. Z. f. physiol. Ch. 1912, Bd. 78, S. 414.
- 72) P r o s k a u e r u. B e c k. Z. f. Hygiene 1894, Bd. 18, S. 128.
- 73) R u p p e l. Z. f. physiol. Chemie 1898, Bd. 26, s. 218.
- 74) " " " " " Die Proteine. Beitr. z. exp. Therap. 1900, H. 4.
- 75) S a b r a z é s. Ann. d'Institut. Past. 1903, p. 303.
- 76) d e S c h w e i n i t z u. D o r s e t. Chem. Centr. 1895 II, S. 609.
- 77) d e S c h w e i n i t z u. D o r s e t. Chem. Centr. 1897, II, S. 1188.
- 78) d e S c h w e i n i t z u. D o r s e t. Centralbl. f. Bakt. 1896, Bd. 19, S. 707.
- 79) d e S c h w e i n i t z u. D o r s e t. Centralbl. f. Bakt. 1898, Bd. 23, S. 993.
- 80) d e S c h w e i n i t z u. D o r s e t. Centralbl. f. Bakt. 1902, Bd. 32, S. 186.

- 81) Sieber. Z. f. physiol. Ch. 1912, Bd. 81, S. 185.
82) Sieber u. Metalnikoff. Centralbl. f. Bakt. 1910, Bd. 54, Orig., S. 349.
83) Sieber. Journ. f. prakt. Chemie, 1881, Bd. 23, S. 412.
84) Straus. La tuberculose et son bacille. Paris 1895.
85) Weinkopf. Z. f. Immunitätsforsch. 1911, Bd. 11, Orig. Nr. 1.
86) Weiss. Münch. med. Woch. 1909, S. 443.
87) Weyl. Deutsche med. Woch. 1891, S. 256.
88) Von Wisselingh. Jahrbücher wissenschaft. Bot. 1898, T. 31, p. 656, 658.
89) Unna. Sitzungsber. d. biologischen Abtheilung des ärztlichen Vereins—Hamburg 1896. S. 148.

**Biblioteka Główna
WUM**

Biblioteka Główna

WUM

Br.6301



000031398



www.dlibra.wum.edu.pl