

26334
TOM XXV

ZESZYT 3—4

A.048
ROK 1947

X
MEDYCYNĄ
DOŚWIADCZALNĄ
I SPOŁECZNĄ

KOMITET REDAKCYJNY:

S. Adamowiczowa — Warszawa, L. Anigstein — St. Zjedn. Am. Póln.,
W. Chodźko — Warszawa, S. Czubalski — Warszawa, L. Hirsfeld —
Wrocław, M. Kacprzak — Warszawa, E. Leyko — Łódź, J. Nowak — Kraków,
B. Nowakowski — Kraków, J. Parnas — Moskwa, L. Paszkiewicz —
Warszawa, F. Przesmycki — Warszawa, L. Rajchman — St. Zjedn. Am. Póln.,
S. Sierakowski — Warszawa, S. Siengalewicz — Poznań, S. Sparrow —
Tunis, Z. Szymanowski — Łódź, R. Weigl — Kraków, C. Wroczyński —
Warszawa, F. Venulet — Łódź

REDAKTORZY: L. HIRSZFELD, M. KACPRZAK, Z. SZYMANOWSKI
WYDAWCA: PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY

Redakcja i Administracja: Państwowy Zakład Higieny, Warszawa, Chocimska 24

PAMIĘCI ZMARŁYCH.

W okresie ostatniej wojny pomiędzy rokiem 1939 a 1945 Redakcja nasza a wraz z nią nauka polska poniosła dotkliwe straty.

Z naszego grona ubyli Koledzy następujący:

Filip Eisenberg
Napoleon Gąsiorowski
Marian Gieszczykiewicz
Aleksander Ławrynowicz
Jerzy Modrakowski
Roman Nitsch
Leon Padlewski.

Trzej z nich zginęli bezpośrednio z rąk oprawcy: *Filip Eisenberg* rozstrzelany we Lwowie, *Marian Gieszczykiewicz* więziony w Oświęcimiu, zanieiony na rozstrzelanie na noszach jako ciężko chory, *Ławrynowicz* zamordowany na progu swojego Zakładu podczas powstania. *Padlewski* więziony w Poznaniu w obozie na Solaczu przeszedł całą gehennę wypędzenia z Poznania. Pozostałym wszystkim okrucieństwa okupacji niewątpliwie skróciły życie. Odkładamy do sposobniejszej chwili szczegółowe omówienie działalności i zasług naukowych naszych drogich Zmarłych. Tu chcemy tylko złożyć pierwszy hołd Ich pamięci.

MEDYCYNĄ DOŚWIADCZALNĄ I SPOŁECZNĄ

(Dawniej Przegląd Epidemiologiczny).

TOM XXIV

WARSZAWA 1947

ZESZYT 3-4

Zakład Bakteriologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik: Prof. Dr med. St. Legeżyński.

Z Państwowego Zakładu Higieny — Zakład Produkcji w Krakowie

Kierownik: Dr med. Z. Przybyłkiewicz

PRECYPITOWANA

SZCZEPIONKA DUROWA-PARADUROWA

(T. A. B. prec.)

ŚLOPEK STEFAN

Uodparnianie czynne przeciw zakaźnym schorzeniom przewodu pokarmowego (dur brzuszny, zakażenia paradurowe, czerwonka), wysuwa się na pierwszy plan w zwalczaniu tych chorób. Dowodzą tego liczne dane statystyczne wskazujące na wybitny spadek zapadalności na te schorzenia i śmiertelności w ich następstwie

Szczepionki bakteryjne stosowane powszechnie w celach zapobiegawczych przeciw zakażeniom pałeczkami durowymi i paradurowymi A i B nie spełniają jednakże w pełni swego zadania. Niedoskonałość ich spowodowana jest przede wszystkim brakiem pełnej kontroli nad własnościami uodparniającymi zawartych w szczepionce bakteryjnej antygenów, tak co do ich jakości jak i ilości. Zwłaszcza przy masowej produkcji kontrola ta jest niezmiernie utrudniona, pomimo daleko idących ostrożności. Następnie pozostaje ona w związku z wprowadzaniem znacznej ilości ciał balastowych o charakterze antygenów-ciał zawartych w komórce bakteryjnej, nie posiadających jednakże istotnego znaczenia przy uodpornieniu ustroju przeciw zarazkowi. Dla łatwiejszego zrozumienia koniecznym jest przypomnienie budowy antygenowej pałeczek durowo-paradurowych i znaczenia poszczególnych antygenów dla odporności organizmu ludzkiego na zakażenie pałeczkami durowo-paradurowymi.

Formy S-pałeczek durowo-paradurowych używane do przygotowywania szczepionek bakteryjnych, zawierają antygen komórkowy-O i rzęskowy-H, nadto niektóre spośród pałeczek durowo-

wych dodatkowy antygen komórkowy (somatyczny) t.zw. antygen Vi. Toksyczność pałeczek durowo-paradurowych związana jest przede wszystkim z antygenem O, a u pałeczek durowych również z antygenem Vi. W nich mieszczą się substancje toksyczne czyli endotoksyny. Chemicznie są to połączenia proteidowo-wielocukrowo-lipoidowe, serologicznie odpowiadają antygenom pełnowartościowym. Antygen rzęskowy H zdaje się przy działaniu toksycznym i uodpornieniu ustroju na zakażenie odgrywać podrzędną rolę.

Na uwagę zasługuje zachowanie się niweczników ustrojowych odpowiadających powyższym antygenom przede wszystkim w ustroju, który nie przeszedł zakażenia pałeczkami durowo-paradurowymi, ani nie był sztucznie uodparniany, następnie u ludzi chorych, wreszcie u ludzi i zwierząt sztucznie uodparnianych.

U ludzi, którzy nie zetknęli się ani w sposób naturalny ani sztuczny z pałeczkami durowo-paradurowymi, stwierdza się aglutyniny dla antygenu rzęskowego H niezmiernie rzadko i to w niskich rozcieńczeniach surowicy (1:25), natomiast aglutyniny dla antygenu somatycznego O spotyka się dość często w rozcieńczeniach surowicy dochodzących do 1:50 i 1:100. Aglutynin Vi z reguły nie stwierdza się.

U chorych na dur brzuszny, względnie schorzenia parurowe A i B pojawiają się najpierw aglutyniny dla antygenu O, wolniej zaś dla antygenu rzęskowego H. Miana aglutynacyjne dla obu antygenów dochodzić mogą do kilku tysięcy. Podkreślić tu należy, że niezależnie od wysokości miana aglutynacyjnego różnica w mianie dla antygenu O i H jest bardzo niewielka. Aglutyniny dla antygenu Vi pojawiają się dość późno, bo dopiero w 3 lub 4 tygodniu choroby, a niekiedy nawet później i osiągają bardzo niskie miana dochodzące najwyżej do rozcieńczenia 1:50.

U ludzi i zwierząt uodparnianych szczepionkami pełnobakteryjnymi powstają przede wszystkim aglutyniny dla antygenu H w słabym zaś stopniu dla antygenu O. Różnice w mianach są w przeciwieństwie do surowic chorych niekiedy bardzo znaczne.

Ilości stosowanego celem uodparniania antygeny, według moich spostrzeżeń opartych na uodparnianiu kilkuset królików (przy produkcji surowic diagnostycznych) wpływają w dużej mierze na wynik uodpornienia. Częste, co 3—4 dni, wprowadzanie małych dawek antygeny dawało o wiele lepsze wyniki (szybkie powstawanie dużych ilości niweczników) niż jedno-

razowe, względnie kilkurazowe wprowadzanie dużych ilości antygeny.

Wreszcie pewną niedoskonałość szczepionek bakteryjnych przedstawia konieczność 2 lub 3 krotnego ich stosowania u jednego osobnika, co niejednokrotnie, zwłaszcza przy szczepieniach masowych natrafia na znaczne trudności.

Wielokrotnie podejmowano próby zastąpienia szczepionek bakteryjnych autolizatami z pałeczek durowo-paradurowych. Próby te zapoczątkowane przez Neissera i Shigę w roku 1903, kontynuowane następnie przez Mc Fadyena i Rowlanda, Buchnera i Hahna, Bassenge i Meyera, Vincenta i wielu innych nie dały zadowalniających wyników. Dopiero badania Grasseta prowadzone w latach 1927—39 zbliżyły nas nieco do celu.

Grasset zastosował autolizaty z pałeczek durowych najpierw do uodparniania zwierząt celem uzyskania surowic leczniczych, następnie przystosował je do uodparniania ludzi.

Technika przygotowywania autolizatów była następująca: zawieszinę 48-godzinnej hodowli na agarze zwykłym w roztworze fizjologicznym NaCl ogrzewał do 58°C przez pół godziny, następnie zamrażał przy -30°C w ciągu 24 godzin, odtajał przy 37°C również w ciągu 24 godzin. Zabieg ten powtarzał 4-krotnie, po czym pozostawiał zawieszinę na przeciąg 1 miesiąca, wreszcie wirował i wyjawiał przez sączenie.

Toksyczność otrzymanego autolizatu była dość duża. Najmniejsza dawka śmiertelna d. m. l. — dosis letalis minima) dla myszek białych wynosiła w przeliczeniu na suchą masę 0,4—0,6 mg; d. l. m. dla królika wahała się od 1,5—2,0 mg. Działanie uodparniające autolizatu było bardzo duże.

W latach 1934—36 Grasset przystosował swą szczepionkę do uodparniania ludzi, działanie jej wypróbował na robotnikach kopalń południowo-afrykańskich; w następnych latach (1937—38) stosował ją z dobrym wynikiem w postaci stężonej jako jednorazową injekcję.

U nas podobnym zagadnieniem zajęli się Morzycki i Zabłocki w latach 1934—35. 48-godzinną hodowlę na agarze zwykłym szczepu durowego, splukiwali wodą destylowaną; gęstą zawieszinę zamrażali przy -10°C w ciągu 18 godzin i odtajali przy 37°C w ciągu 6 godzin. Zabieg ten powtarzali 14 razy w ciągu dwu tygodni, następnie zawieszinę wirowali przez pół godziny przy 4000 obrotów na minutę, sączyli przez filtr Chamberlanda L^1 i L_3 . Przesącz przechowywali w chłodni pod toluolem.

Otrzymana przez nich zw. frakcja C odpowiadała endotoksynie i przedstawiała się jako ciało ciepło-stale, bezbiałkowe

zawierające 3% N, dające dodatni odczyn węglowodanowy Molischa, o własnościach antygenu pełnowartościowego. Toksyczne działanie było dość słabe. Dawka na pewno śmiertelna (d. c. 1. — dosis certe letalis) wynosiła dla myszki białej około 0,5 cm³ autolizatu. Celem odzjadliwienia autolizatu wspomniani autorowie dodawali 1% formaliny i przechowywali w cieplarni 37° C przez przeciąg 3 miesięcy. Toksyczność otrzymanej tym sposobem t. zw. anatoksyny durowej spadała zdaniem autorów bardzo znacznie, przy zachowanych własnościach uodparniających.

Morzycki i Zabłocki zastosowali otrzymaną przez nich anatoksynę durową do uodparniania ludzi (Atoksyczna szczepionka tyfusowa). Ogółem wypróbowali ją na 3000 osób stosując dwurazowe uodparnianie (0,5 i 1,0 cm³) 10-krotnie rozcieńczoną anatoksyną durową w odstępach 8—10 dniowych. U 4% uodparnianych poza odczynem miejscowym, spostrzegali podniesienie ciepłoty do 38° C. U reszty występował jedynie odczyn miejscowy w postaci nacieku przekrwienia i bólesności. U 50 szczepionych skontrolowali wysokość miana aglutynacyjnego we krwi w 10 dni po zaszczepieniu. W 94% przypadków miano to wahało się od 1:100 do 1:3200.

W roku 1942 ogłoszona została praca Lovrekovicha i Raussa, którzy zmodyfikowali i ulepszyli szczepionkę przeciwdurową Grasseta.

Zawiesinę 24-godzinnej hodowli na agarze zwykłym (pH=8,0) pałeczek duru brzuszego, zawierających antygeny O, H i Vi, poddawali zamrażaniu przy —20° C przez 12 godzin i odtajaniu przy 37° C również w ciągu 12 godzin. Zabieg ten powtarzali w ciągu 5 dni, po czym zawiesinę wirowali, sączyli przez sączek Seitza i dla utrwalenia dodawali 0,3% fenolu.

Otrzymany produkt przedstawiał się jako płyn żółtawy, opalizujący, lekko lepki; zawartość N dochodziła do 1,5—1,7 mg/cm; toksyczność oznaczana na myszkach białych wagi 18—20 gr po wstrzyknięciu dootrzewnowym wynosiła od 0,05—0,1 cm³; formalina nie pozbawiała toksyczności ekstraktu; ogrzanie do 100° C w ciągu godziny nie niszczyło działania antygenowego; ekstrakt nie ulegał żadnym zmianom w ciągu 3-letniej obserwacji. Lovrekovich i Rauss określili otrzymany ekstrakt jako endotoksynę.

Działanie uodparniające powyższego ekstraktu było bardzo duże. 2 cm podzielone na 5 dawek, podane dożylnie królikowi co 5 dni dawało surowice o mianach dochodzących do 1:50,000. Podobnie duże było działanie ochronne ekstraktu;

myszki, którym wstrzyknięto podskórnie 0,25 cm³ ekstraktu znosiły w 10 dni po zastrzyku 2 najmniejsze dawki śmiertelne.

Celem zwolnienia wysysania ekstraktu po wstrzyknięciu podskórnym, Lovrekovich i Rauss strącali go wodorotlenkiem glinu, przez doprowadzenie oddziaływania ekstraktu, do którego uprzednio dodano alun glinowo-potasowy, do pH=6,2—6,4. Na wypadającym przy tym wodorotlenku glinu adsorbowały się czynne antygenowo ciała ekstraktu. Po przemyciu strątu sporządzono z niego zawiesinę, która wstrzyknięta do tkanki podskórnej wolniej się resorbowała.

Stężenie antygenu uodporniającego określali w jednostkach ochronnych mysich, tak by na 1 cm szczepionki przypadało 10 jednostek ochronnych mysich. Jednostka ochronna mysia stanowiła tę ilość antygeny (ekstraktu), która uodparniała myszkę po wstrzyknięciu podskórnym przed 1 minimalną dawką śmiertelną. Przeciętnie 10 jednostek ochronnych mysich przypadało na 1 minimalną dawkę śmiertelną mysia.

Zawartość N w precypitacie spadała do około 0,4 mg/cm. Przemawiałoby to za tym, że strąceniu ulegają przede wszystkim ciała o charakterze wielocukrów, a odpada część połączeń białkowych.

Działanie ochronne precypitatu było dwukrotnie silniejsze od samego ekstraktu; w tych samych warunkach myszki uodparniane precypitatem znosiły 4 najmniejsze dawki śmiertelne. Surowica królików uodparnianych szczepionką precypitowaną działała przy uodparnianiu biernym dwa razy silniej od surowicy antibakteryjnej.

Lovrekovich i Rauss wykonali również próby uodparniania szczepionką precypitowaną ludzi z korzystnym wynikiem.

Rauss w tymże samym roku ogłosił wyniki nasowego uodparniania ludzi szczepionką durową precypitowaną. Szczepienia te przeprowadzono na górnych Węgrzech w Okręgu Zemplen w środowisku wynoszącym 33.834 mieszkańców.

12.813 osób zaszczepiono jednokrotnie szczepionką precypitowaną, wstrzykując podskórną 1 cm³ precypitatu;

10.962 osób szczepiono trzykrotnie szczepionką przeciwdurową bakteryjną;

10.059 osób stanowiło kontrolę.

Odczyny poszczepienne były nieznaczne, przeważały odczyny miejscowe (przekrwienie, nieznaczny obrzęk, bolesność); odczyny te z reguły ustępowały w ciągu 72 godzin. Z odczynów ogólnych, podniesienie ciepłoty ponad 39° C, osłabienie bóle głowy, zaburzenia żołądkowo-jelitowe należały do rzadkości.

Dzieci znosiły szczepienia naogół lepiej niż dorośli.

Uodparnianie szczepionką precypitowaną dało lepsze wyniki niż uodparnianie szczepionką bakteryjną. Zachorowalność wynosząca u ludzi nieszczepionych 32,8 na 10,000, spadła po zastosowaniu jednorazowej iniekcji szczepionki precypitowanej do 7, zaś po trzykrotnym szczepieniu szczepionką bakteryjną do 8,2 na 10.000.

Korzystne wyniki, otrzymane przez Grasseta, Lovrekovicha i Raussa z precypitowaną szczepionką durową, były dla mnie podniecią do sporządzenia i wypróbowania szczepionki durowo-paradurowej z autolizatów pałeczek duru brzusz nego, paradurow A i B, w postaci precypitowanej szczepionki duro-paradurowej (T.A.B. prec.).

Technika otrzymywania autolizatów z pałeczek durowych i paradurowych A i B, oraz strącania wodorotlenkiem glinu była następująca:

24—36 godzinną hodowlę na agarze zwykłym ($\text{pH}=7,4-7,6$) zawieszano w roztworze fizjologicznym soli kuchennej, tak by na 1 cm zawiesiny przypadało około 50 miliardów drobnoustrojów, czyli około 100 mg drobnoustrojów na 1 cm zawiesiny. Następnie poddawano bakterie zamrażaniu i odtajaniu (12 godzin w chłodni przy -20°C i 12 godzin w cieplarni 37°C) w ciągu 14 dni; w tym czasie większość drobnoustrojów ulega autolizie. Celem zabicia pozostałych jeszcze przy życiu bakterii, ogrzewano zawiesinę w parze bieżącej przez 15 minut, kontrolowano na jałowość, wirowano przy 3—3.500 obrotów na minutę, wreszcie sączono przez filtr Berkefelda. Otrzymany przesącz przechowywano bez dodatku środków konserwujących w chłodni przy $+4^{\circ}\text{C}$.

Analiza fizyko-chemiczna otrzymanych autolizatów wykazała, że zawierają one przede wszystkim połączenia wielocukrowo-lipoidowe, z nieznaczną domieszką połączeń białkowych. Zawartość N wahała się od 1,5—2,0 mg/cm. Ogrzanie nie niszczyło działania antygenowego autolizatu; nie ulegał on również zmianom przy dłuższym przechowywaniu. Formalina nie osłabiała jego toksyczności.

Toksyczność uzyskanych preparatów oznaczana w minimalnych dawkach śmiertelnych na myszkach białych wagi 18—20 gr. (tab. 1a) wynosiła dla autolizatu z pałeczek duru brzusz nego i paraduru B 0,025 cm., zaś dla autolizatu z pałeczek paraduru A 0,005 cm. Iniekcje toksyn wykonywano dożylnie, wstrzykując roztwory autolizatów w objętości 0,5 cm³. Myszkę ginęły w czasie od 12—18 godzin od chwili wprowadzenia jadu. Króliki (tab. 1 b.) ginęły po dożylniej iniekcji 4 minimalnych dawek śmiertelnych mysich w ciągu 48 godzin

Tabela 1a.

Oznaczanie toksyczności autolizatów pałeczek durowych i paraduru A i B na myszkach białych wagi 18–20 g.

Dawka autolizatu:

Autolizat:	0.001	0.005	0.01	0.025	0.05	0.1 cm.	Kontrola
Ty	0	0	1	3	3	3	0
Pty A	0	3	3	3	3	3	0
Pty B	0	0	1	3	3	3	0

Uwaga: liczby wskazują ilość myszek białych padłych (każde rozcieńczenie autolizatu wstrzykiwano 3 myszkom):

myszkom kontrolnym wstrzykiwano po 0.5 cm. r. fizj. Na Cl.

Tabela 1b.

Oznaczanie toksyczności autolizatów pałeczek durowych i paradurowych A i B na królikach wagi około 2 kg.

Dawka autolizatu (w jednostkach mysich d.l.m.)

Autolizat:	1	2	3	4	5 d.l.m.
Ty	0	0	0	6×24	3×24
Pty A	0	0	0	3×24	2×24
Pty B	0	0	0	6×24	3×24

Uwaga: liczby wskazują czas (w godzinach) w którym zwierzęta padły (każdą dawkę wstrzykiwano 2 królikom).

Tabela 2.

Uodpornianie czynne autolizatami pałeczek durowych i paradurowych A i B królików wagi około 2 kg.

Uwaga: każdym autolizatem uodporniano po 2 króliki;
autolizaty wstrzykiwano dożylnie co 3 dni w następujących dawkach:
0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 dlm. dla myszki;
miano aglutynacyjne oznaczono przy użyciu żywych bakterii

Uzyskane miano aglutynacyjne:

Ty	Pty A	Pty B
1: 6.400	12.800	6.400
12.800	25.600	12.800

do 1 tygodnia. Dawka 4 minimalnych dawek śmiertelnych podzielona na 5 części i podawana królikowi dożylnie w odstępach 3--4 dniowych, uodparniała królika. Miano aglutynacyjne surowicy wahało się od 1:6, 400 do 25,000. Typ aglutynacji mieszany z przewagą aglutynacji grudkowej (tab. 2).

Celem otrzymania precypitowanej szczepionki durowo-paradurowej do uodparniania zwierząt i ludzi dodawano do autolizatu równą objętość 5% roztworu alunu potasowego (wyjaławianego przez sączenie) i nastawiano pH na 6,2—6,4 przy pomocy 1% wodorotlenku sodowego. Na powstającym strącie adsorbowały się czynne antygenowo ciała autolizatu. Po kilkugodzinnej sedymentacji odrzucano płyn z nad osadu, osad zaś przepłukiwano trzykrotnie roztworem fizjologicznym soli kuchennej. Następnie celem końcowego rozcieńczenia szczepionki dodawano roztworu fizjologicznego NaCl z dodatkiem 0,3% fenolu

Szczepionkę rozcieńczano tak by na 1 cm³ zawiesiny przypadły 2 minimalne dawki śmiertelne autolizatu.

W celu przygotowania precypitowanej szczepionki durowo-paradurowej (T.A.B. prec.) mieszano precypitaty, biorąc 5 części precypitatu z autolizatu pałeczek durowych, 2 części precypitatu z autolizatu pałeczek paraduru A i 3 części precypitatu z autolizatu pałeczek paraduru B.

Wartość precypitowanej szczepionki durowo-paradurowej (T.A.B. prec.), oraz szczepionek monowalentnych durowej, paraduru A i B wypróbowano w doświadczeniach na myszkach białych (tab. 3). Zaszczepiono podskórnie 4 serie myszek wagi 18—20 gr. po 0,25 i 0,5 cm. odpowiedniej szczepionki. Po dziesięcio-dniowej przerwie wstrzykiwano myszkom dożylnie odpowiedni autolizat, względnie mieszaninę autolizatów w tym samym stosunku w jakim mieszano precypitaty celem uzyskania szczepionki mieszanej durowo-paradurowej. Szczepione myszki obserwowano w ciągu 14 dni.

Wynik uodparniania był następujący:

Myszki kontrolne, którym wstrzyknięto 1 minimalną dawkę śmiertelną odpowiedniego autolizatu, względnie mieszaninę autolizatów, padły w ciągu 12 godzin.

Myszki szczepione 0,25 cm. szczepionki durowej i parurowej B znosiły bez szkody 8 minimalnych dawek śmiertelnych, zaś myszki uodparniane szczepionką parurową A i mieszaną T.A.B. wytrzymały 16 minimalnych dawek śmiertelnych.

Myszki szczepione dawką 0,5 cm., znosiły przy szczepionkach durowej, paraduru A i B 20 minimalnych dawek

T a b e l a 3.

Oznaczanie wartości uodparniających precypitowanych szczepionek Ty, Pty A, Pty B i T. A. B. prec.

Seria 1: Myszki białe (wagi 18–20 gr) zaszczepione podskórnie precypitowaną szczepionką durową (Ty).

Dawka jadu (autolizatu)	dawka szczepionki:		Kontrola
	0.25 cm.	0.5 cm.	
1 d.l.m.	3	3	+ 12 godz.
2	3	3	+ 12 godz.
4	3	3	
8	2	3	
16	1	3	
20	0	2	
25	0	0	

Uwaga: Na każde rozcieńczenie jadu używano 3 myszek.
Jad wstrzykiwano w 10 dni po wstrzyknięciu szczepionki;
liczby wskazują ilość myszek pozostałych przy życiu po 14 dniach
od chwili wstrzyknięcia jadu.

Seria 2: Myszki białe (wagi 18–20 gr) zaszczepione podskórnie precypitowaną szczepionką paraduru A (Pty A).

Dawka jadu (autolizatu)	dawka szczepionki:		Kontrola
	0.25 cm.	0.5 cm.	
1 d.l.m.	3	3	+ 12 godz.
2	3	3	+ 12 godz.
4	3	3	
8	3	3	
16	3	3	
20	1	2	
25	0	1	

Uwaga: jak w serii 1.

Seria 3: Myszki białe (wagi 18–20 gr) zaszczepione podskórnie precypitowaną szczepionką paraduru B (Pty B).

Dawka jadu (autolizatu)	dawka szczepionki:		Kontrola
	0.25 cm.	0.5 cm.	
1 d.l.m.	3	3	+ 12 godz.
2	3	3	+ 12 godz.
4	3	3	
8	2	3	
16	1	3	
20	0	2	
25	0	0	

Uwaga: Jak przy serii 1.

Seria 4: Myszki białe (wagi 18—20 gr) zaszczipione podskórnie precypitowaną szczepionką durowo-paradurową (T. A. B. prec.)

dawka szczepionki:

Dawka jadu x) (autolizatu)	0.25 cm.	0.5 cm.	Kontrola
1 d. l. m.	3	3	+ 18 godz.
2	3	3	+ 12 godz.
4	3	3	
8	3	3	
16	2	3	
20	1	3	
25	0	2	

Uwaga: Jak w serii 1:

x) Używano mieszaniny jądów (autolizatów) w stosunku 5:2:3 odpowiadającym mieszaninie poszczególnych precypitatów w szczepionce.

śmiertelnych odpowiedniego autolizatu, zaś przy szczepionce mieszanej T. A. B. 25 minimalnych dawek śmiertelnych.

Większą odporność myszek szczepionych szczepionką mieszaną tłumaczyć można, zgodnie ze spostrzeżeniami Haasa, Morgana i Beckwitha działaniem wspólnych antygenów pałeczek durowo-paradurowych (I, XII).

Zachodziłoby więc przy szczepionce mieszanej durowo-paradurowej raczej sumowanie się działania uodporniającego niż konkurencja antygenów.

Kontrolę działania uodporniającego wykonano również u ludzi. Zastosowano jednokrotną injekcję precypitowanej szczepionki durowo-paradurowej (T. A. B. prec.), podskórną w objętości 1 cm. u dorosłych, a 0,5 cm. u dzieci. Skład mieszanej szczepionki durowo-paradurowej jak przy uodpornianiu zwierząt. Odczyn poszczepienny (obserwacja 300 osób w wieku od lat 6 do 60) był naogół słaby (tab. 4); w 2—3 godzin po

Tabela 4.

Wyniki szczepienia ludzi precypitowaną szczepionką T. A. B.

Wiek	odczyn poszczepienny:		
	brak	miejscowy: słaby	ogólny (obok miejscowego) wyraźny
6 — 12 lat	6	14	0
12 — 18 „	4	18	2
powyżej 18 „	15	216	25

Uwaga: Liczby wskazują ilość osób.

szczepieniu pojawiało się przekrwienie, bolesność i nieznaczny obrzęk; objawy te nasilały się do 12 godzin, poczem w ciągu następnych 24—36 godzin znikaly zupełnie. W miejscu szczepienia pozostawał jedynie nieznaczny guzek, który zwolna ulegał resorpcji. Odczyn ogólny w postaci podniesienia ciepłoty ponad 38° C, osłabienia wystąpił jedynie w 2% przypadków, miał on jednakże znacznie słabsze nasilenie niż po stosowaniu szczepionek bakteryjnych. Liczba odczynów poszczepiennych u dzieci była znacznie mniejszą niż u dorosłych; dzieci, zgodnie ze spostrzeżeniami Raussa, znoszą szczepienie precypitowaną szczepionką o wiele lepiej niż dorośli.

Kontrolę zachowania się aglutynin we krwi przed i po szczepieniu przeprowadzono u 31 osób. Dała ona następujący wynik.

Odczyn aglutynacyjny nastawiano z żywymi zawiesinami Ty H, TyO 901-Felix, Pty A i Pty B; szczepy Pty A i Pty B posiadały dobrze rozwinięte antygeny H i O.

Tabela 5.

Miana aglutynacyjne przed szczepieniem:

	0	1:10	1:20	1:40	wyżej
Typhus H	25	3	2	1	0
O 901	20	5	4	2	0
Paraty A	6	3	2	0	0
B	28	2	1	0	0

Miana aglutynacyjne po szczepieniu:

	1:							
	40	80	160	320	640	1280	2560	wyżej
Typhus H	2	7	8	7	3	2	2	0
O 901	0	0	3	12	11	3	2	0
Paraty A	3	11	11	6	0	0	0	0
B	1	7	14	6	3	0	0	0

Uwaga: Liczby wskazują ilość surowic.

Jak z powyższego widzimy, precypitowana szczepionka duro-paradurowa jest doskonałym bodźcem do wytwarzania swobodnych niweczników. W przeciwieństwie do szczepionek bakteryjnych wzbudza wytwarzanie znacznych ilości niweczników dla antygeny O. Obraz aglutynacyjny surowic osób odpornianych szczepionką precypitowaną przedstawia się podobnie jak u chorych na dur brzuszny.

W kilku przypadkach skontrolowano również szybkość narastania niweczników we krwi u osób szczepionych szczepionką precypitowaną. Po upływie około 7—8 dni od chwili szczepienia stwierdza się miana o $1\frac{1}{2}$ do $3\frac{3}{4}$ niższe niż na 12 dzień; później poziom ten utrzymuje się na pewnej wysokości przez kilka tygodni, po czym zwolna opada.

Wolne narastanie miana aglutynacyjnego wskazywałoby na powolne wysysanie się szczepionki precypitowanej.

Poza oznaczeniem wysokości miana aglutynacyjnego przed i po szczepieniu, oznaczono również wartość ochronną surowic osób nieszczepionych i szczepionych precypitowaną szczepionką durowo-paradurową (tab. 6).

Tabela 6.

Oznaczanie wartości ochronnej surowic ludzkich przed i po uodpornieniu precypitowaną szczepionką T. A. B.

(0.75 cm surowicy ludzkiej i 0.75 cm mieszaniny autolizatów o stężeniu 1, 2, 5 i 10 d l. m. dla myszki wstawiano po zmieszaniu do cieplarki 37° C na 1 godzinę — następnie wstrzykiwano 3 myszkom białym po 0.5 cm odpowiedniej mieszaniny. Waga myszek od 18 — 20 gr. Obserwacja zwierząt do 14 dni od chwili wstrzyknięcia).

	chroni myszki białe przed:			
Surowica ludzi:	1	2	5	10 d. l. m.
przed uodpornieniem	0	0	0	0
po uodpornieniu	1	4	13	13
Kontrola	0	0	0	0

Uwaga: Liczby wskazują ilość surowic.

Badania te wykonano na myszkach białych wagi 18—20 gr wstrzykując im dożylnie mieszaninę surowicy i autolizatów z pałeczek durowych, paraduru A i B, (stosunek jak w szczepieniu) o stężeniu 1, 2, 5 i 10 minimalnych dawek śmiertelnych w 0.5 cm płynu. Obserwacja trwała około 14 dni.

Myszki kontrolne, które otrzymały autolizaty w roztworze fizjologicznym NaCl padły w ciągu 12—18 godzin.

Po wstrzyknięciu mieszaniny surowic osób nieszczepionych i autolizatów myszki ginęły, podobnie jak zwierzęta kontrolne. Surowica osób przed zaszczepieniem działania ochronnego przy uodparnianiu biernym nie wykazywała.

Wartość ochronną surowic osób szczepionych w porównaniu z wysokością miana aglutynacyjnego przedstawia nam następujące zestawienie:

T a b e l a 7.

Ilość surowic zobojętniających autolizaty o stężeniu		1	2	5	10 d.l.m.
		1	4	13	13
Wysokość miana aglutynacyjnego dla: Typhus H			40— 160	160— 2560	160— 2560
		80	160— 320	320— 2560	320— 2560
	O 901	160	80— 160	40— 320	80— 320
Paraty	A	40		80— 640	80— 640
	B	40	160		

Uwaga: Liczby wskazują rozcieńczenia surowiec.

Jak z powyższego zestawienia widzimy, wartość ochronną surowic osób szczepionych jednokrotnie precypitowaną szczepionką durowo-paradurową jest bardzo duża; w większości przypadków surowice zobojętniały 5 i 10 minimalnych dawek śmiertelnych.

Porównując działanie ochronne surowic z wysokością miana aglutynacyjnego widzimy, że pomiędzy zawartością aglutynin we krwi osób szczepionych i wartością ochronną surowicy zachodzi pewien związek. Zbyt mała ilość przypadków nie pozwala na wysnucie pewnych wniosków. Zagadnienie to będzie tematem osobnych badań, mających na celu ustalenie na dużym materiale, o ile z wysokości miana aglutynacyjnego można wnosić o odporności ustroju na zakażenie pałeczkami durowo-paradurowymi. Otrzymane wyniki na taki związek wskazują i zachęcają do dalszych badań w tym kierunku.

Działanie zapobiegawcze precypitowanej szczepionki durowo-paradurowej (T.A.B. prec.) u ludzi na szerszą skalę w terenie jest przedmiotem obecnych badań.

W czasie akcji szczepiennej przeprowadzanej przez Nadzwyczajny Komisarjat do Walki z Epidemiami w Krakowie, przeszczepiono z końcem czerwca i lipca roku 1946, na terenie miast Tarnowa i Mościc, oraz okolicy około 10.000 osób jednorazowo precypitowaną szczepionką T.A.B.; dla porównania zaszczipiono tę samą ilość osób dwukrotnie bakteryjną szczepionką durowo-paradurową wyrabianą przez Zakład Produkcji P. Z. H. w Krakowie. Zaznaczyć należy, że do przygotowania obu rodzajów szczepionek użyto tych samych szczepów bakteryjnych. Wyniki tych szczepień zostaną ogłoszone po zebraniu odpowiednich danych co do zapadalności na dur brzuszny i schorzenia paradurowe i śmiertelności wśród mieszkańców wyżej wspomnianych okolic.

Wreszcie podkreślić należy, że wydajność produkcyjna szczepionki precypitowanej durowo-paradurowej (T.A.B. prec) dorównuje wydajności szczepionki bakteryjnej, czyli z tej samej ilości materiału wyjściowego, można ciężki specjalnym zabiegiem uzyskać taką samą ilość szczepionki bardziej wartościowej.

Na podstawie przedstawionych wyników wysnuć można następujące wnioski:

1. Precypitowana szczepionka durowo-paradurowa (T.A.B. prec.) wysuwa się na czoło zapobiegawczych szczepionek przeciw durowi brzuszemu i paradyrom A i B, dzięki:

- a. możliwości dokładnej kontroli jakościowej i ilościowej antygenów w niej zawartych;
- b. ograniczeniu do minimum balastowych ciał antygenowych i zastąpieniem ich ciałem bez własności antygenowych — jakim jest wodorotlenek glinu — utrudniający wysysanie się szczepionki przy wprowadzeniu podskórnym i umożliwiający pełne i długotrwałe działanie antygenów zawartych w szczepionce;
- c. łagodnej technice, pozwalającej na wyosobnienie z komórki bakteryjnej antygenów w stanie zbliżonym do tego, w jakim znajdują się w komórce, a odgrywających istotną rolę w uodpornieniu ustroju na zakażenie; szczepionka zawiera głównie połączenia wielocukrowo-lipidowe z nieznaczną domieszką połączeń białkowych;
- d. ograniczeniu do minimum natężenia odczynów poszczepiennych zależnych od rodzaju szczepionki;
- e. uproszczeniu szczepień masowych, pozwalającym, przy jednorazowym szczepieniu na równoczesne uodpornienie przeciw durowi brzuszemu i paradyrom A i B.

2. Precypitowana szczepionka durowo-paradurowa (T.A.B. prec.) jest doskonałym bodźcem pobudzającym ustrój ludzki czy zwierzęcy do wytwarzania swoistych niweczników. Obraz aglutynacyjny w surowicy osób szczepionych jest podobny do tego, jaki widzimy u chorych.

3. Działanie zapobiegawcze precypitowanej szczepionki durowo-paradurowej w doświadczeniu na myszkach białych, było bardzo duże; zwierzęta szczepione dawką 0,25 cm szczepionki podskórne znosiły bez szkody do 10 dniach dożylną iniekcję od 8—16 minimalnych dawek śmiertelnych autolizatów.

4. Podobnie duże było również działanie ochronne surowic osób szczepionych precypitowaną szczepionką durowo-paradurową; większość surowic zobojeźniała od 5—10 minimalnych dawek śmiertelnych w doświadczeniu na myszkach białych.

Surowice osób nieszczepionych działania ochronnego nie posiadały.

5. Zestawienie wartości ochronnej i wysokości miana aglutynacyjnego surowic osób uodpornianych precypitowaną szczepionką durowo-paradurową, wskazuje na ich wzajemną zależność.

6. Technika przygotowywania i miareczkowania precypitowanej szczepionki durowo-paradurowej (T.A.B. prec.) jest bardzo prosta, a wydajność jej dorównuje w zupełności szczepionce bakteryjnej.

Bacteriological Institute of Jagellonian University in Cracow.

Director: Prof. Dr Legezynski St.

Production Department of the State Hygiene Institute in Cracow.

Director: Dr med. Z. Przybylkiewicz.

ALAUN-PRECIPIATED TYPHOID-PARATYPHOID

VACCINE (T. A. B. prec.)

SLOPEK ST.

SUMMARY AND RESULTS.

The results of the investigations of the possibility of applying the alaun-precipitated typhoid-paratyphoid vaccine in preventing typhoid and paratyphoid fever are presented herewith.

The above vaccine has been obtained by isolation of the antigens being active in immunizing the human body out of the bacterial cells by means of freezing and defreezing, followed by the adsorption on aluminium hydroxide.

These manipulations have been carried out with the purpose:

1. to isolate the antigens having a basic significance in immunizing the human body against the typhoid-paratyphoid infections out of bacterial cells;
2. to eliminate as much as possible the balast cell antigens, having no essential significance in the immunity;
3. to isolate the antigens by avoiding as much as possible any alterations of them by using a mild extraction technique;
4. to introduce an indifferent balast material having no antigen properties, which should delay the resorption and enable the full and long duration action of the antigens of the vaccine;
5. to be able to control the immunizing antigens in an accurate way quantitatively as well as qualitatively.

The autolysates obtained are proteido-polysaccharidic-lipoidic in nature.

The toxicity (d. l. m.) of the autolysates for white mice (18—20 g weight) has been found to be 0,005—0,025 ml. depending on the microorganism strain used. The mice died within 12—18 hours after an intravenous injection of 1 d.l.m.

The minimum lethal dose for rabbits was about four times greater than the one for mice. The rabbits died within 2—7 days after the intravenous injection. Smaller doses have given immunizing effects; 4 d.l.m. divided in 5 successive increasing doses injected intravenously into rabbit every 3—4 days have given the production of agglutinins of a titer 1:6,400 — 1:25,000; they were mostly cell-agglutinins, sometimes flagellar-agglutinins.

In order to prepare the typhoid-paratyphoid precipitated vaccine we have mixed the precipitate of the autolysate of typhoid organisms (5 parts), paratyphoid A organisms (2 parts) and paratyphoid B organisms (3 parts) using each precipitate in dilution of 2 d. l. m. of autolysate in 1 ml. of liquid.

The value of the precipitated typhoid-paratyphoid vaccine has been assayed by the preventing-power of white mice (18—20 g. weight) against injection of autolysate.

Within 10 days after the subcutaneous injection of 0,25 ml. of the vaccine the mice survived after being given intravenously 8—16 d.l.m. of the autolysate.

Owing to the aluminium-technique the slow resorption of the vaccine enabled the use of a single dose when making preventing experiments with humans.

The preventive power of the vaccine had been determined in human beings too. 300 persons have been vaccinated by the injecting a single dose of the precipitated typhoid-paratyphoid vaccine subcutaneously: adults 1,0 ml. children 0,5 ml.

The general after vaccination reaction (temperature rise 38°C and over, weakness) has been observed in 6 cases (2%), the local reaction (erythema, slight oedema and pain) with a duration of 24—48 hours — in 27 cases (9%), very slight local reaction with a duration of 24 hours has been found in 248 cases (81%). No reaction: 25 cases. The quantity as well as the intensity of the reactions has been found much less accentuated in children than in adults.

The agglutinin blood levels and the preventive power of the sera of the vaccinated persons before as well as after the single injection of our precipitated vaccine have been investigated in 31 persons. Our vaccine has been found to be an excellent stimulus to the human organism for the production of antibodies. The agglutinin titer have risen from the dilutions 1:40 to 1:2,560 (mostly 1:320—1,640) before and after the vaccination respectively.

0.25 ml. of the serum of persons vaccinated with a single dose of the typhoid-paratyphoid vaccine prevented the white mouse against 5—10 d. l. m. of autolysate, the sera of untreated persons being inactive.

The antibody blood levels in vaccinated persons rise slowly; the first assays should be made not earlier than the 12-th day after the injection.

The parallel summizing of preventing power and the agglutinin titer of the sera of persons vaccinated by our vaccine indicate their reciprocal relationship.

The further investigations tend to determine the preventive power of our vaccine in humans on a larger scale. During the vaccination campaign in 1946 10.000 persons in the towns Tarnow, Mościce and their vicinities have been vaccinated with a single dose of our vaccine. Also bacterial vaccine (2 doses) has been used. The results will be published.

The production yield of our precipitated vaccine equals the efficiency of the bacterial vaccine, i. e. it is possible to obtain by means of special methods the same quantity of the more valuable vaccine using the same quantity of the primary material.

The technique of preparation and titration of our precipitated vaccine is very simple.

PIŚMIENNICTWO .

1. Gory M., Grasset E.: C. r. Soc. Biol. 1928, 98, 435.
2. Grasset E.: J. of Med. Assoc. South Africa 1930 1, 389.
3. Grasset E.: C. r. Soc. Biol. 1931, 106 810.
4. Grasset E.: C. r. Soc. Biol. 1934. 115. 1485.
5. Grasset E.: C. r. Soc. Biol. 1934 115 1599.
6. Grasset E.: Assoc. intern. pediatr. prév. VI Conf. Roma 1937.
7. Grasset E.: Ann. Inst. Pasteur 1938. 61. 791.
8. Grasset E.: Brit. Med. J. 1939, nr. 1993. 58.
9. Grasset E., Gory M.: C. r. Soc. Biol. 1927. 96. 180.
10. Grasset E., Gory M.: C. r. Soc. Biol. 1927, 96, 1211.
11. Grasset E., Levin: C. r. Soc. Biol. 1936, 123, 682.
12. Grasset E., Levin: Brit. J. exp. Path. 1936. 17, 179.
13. Grasset E., Levin, van der Merwe: S. Africa Med. J. 1937, 11, 660.
14. Haas R.: Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1939. 96. 275.
15. Lovrekovich I., Rauss K.: Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1942, 101, 194.
16. Morgan E. R., Beckwith T. D.: J. of Bact. 1939, 37, 389.
17. Morzycki J., Zabłocki B.: Med. Dośw. i Społ. 1934. XIX, 201.
18. Rauss K.: Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1942, 101, 211.
19. Schmidt H.: Grundlagen der spezifischen Therapie. Berlin 1940. VI. Typhus 583—662.
20. Topley W., W., C., Wilson G., S.: The principles of Bacteriology and Immunity 11ed. 1937. Chapter LXVI. Enteric infections. The agglutination Reaction in Diagnosis 1205—1215.
21. Własiewski N., D., Lubarski W., A., Chatenewer L., M.: Rukowodstvo po wakcynnomu i siworotocznomu dietu (w języku rosyjskim). Moskwa—Leningrad 1934.
22. Zabłocki B., Morzycki J.: Med. Dośw. i Społ. 1934. XIX, 189.
23. Zabłocki B., Morzycki J.: Med. Dośw. i Społ. 1935. XX. 487 (175).

Z Państwowego Zakładu Higieny, Centrala w Łodzi
(Naczelny Dyrektor: Prof. Dr F. Przesmycki)

PRÓBY OCENY WŁASNOŚCI UODPORNIAJĄCYCH SZCZEPIONEK PRZECIW DUROWI PŁAMISTEMU.

EDMUND WOJCIECHOWSKI

W okresie przedwojennym stosowano w Polsce do szczepień ochronnych przeciw durowi płamistemu prawie wyłącznie szczepionkę zawierającą zarazek zabity, sporządzoną z jelit wszy zakażonych sztucznie metodą prof. Weigla. Szczepionka ta wyrabiana w Zakładzie Biologii Uniwersytetu J. Kazimierza we Lwowie przebyła wiele kontroli zarówno na zwierzętach laboratoryjnych jak i w terenie na ludziach. Wyniki szczepień na terenie Polski były korzystne, jak to wykazują prace Weigla (1), Chodźki (2), Palestra (3), Radły (4) i innych. Również sprawozdania ze stosowania szczepionki weigłowskiej za granicą podnoszą jej skuteczność, wystarczy wymienić prace Gajdosa i Tchanga (6), Knacka (8) i Mathewsa (9) o szczepieniach w Chinach północnych, dalej prace Shahim Pacha M. (7) z Egiptu, wreszcie Marianiego (10) oraz Herzig A. (11) o wynikach w Abisynii.

Próby uodparniania zwierząt laboratoryjnych podjęte przez wielu autorów wykazały prawie we wszystkich wypadkach właściwości uodparniające tej szczepionki. Badania te przeprowadzano głównie na świnkach morskich, które należą do najwrażliwszych zwierząt doświadczalnych w stosunku do zarazka duru płamistego. Oprócz świnek używali niektórzy autorowie małpy i królików.

Pierwszy da Rocha-Lima (12) przebadał szczepionkę sporządzoną z jelit wszy, zakażonych w sposób naturalny na chorym, szczepiąc świnki morskie 2 lub 3-krotnie co 7 dni dawkami 5, 10 i 20 jelit roztartych i zawieszonych w 0,5% fenolu. Świnki te następnie zakażył wirusem pasażowym duru płamistego (zawiesiną mózgu świnki zakażonej durem pl.); większość z nich okazała się odporna t. zn. nie zachorowała w sposób typowy z gorączką

i innymi objawami. Badania te powtórzyli później Dörr i Schnabel (13) nie uzyskując jednak pozytywnych wyników uodparniania. Kiedy jednak zaczęto sporządzać szczepionkę z jelit wszy zakażonych sztucznie według metody prof. Weigla, wielu autorów wraz z twórcą tej metody Weiglem (14) stwierdziło silne własności uodparniające tej szczepionki u świnek. Breinl (15) uzyskał pełną odporność świnek szczepiąc je podskórnie lub dootrzewnowo 50–67 jelitami wszy zakażonych (zarazek był zabity 0,5% fenolem), podczas gdy świnki kontrolne szczepione jelitami wszy zdrowych chorowały po zakażeniu wirusem pasażowym duru plamistego w sposób typowy. Nicolle Ch. i Sparrow H. (16) szczepili świnki podskórnie 2 lub 3-krotnie stosując w dawkach wzrastających w sumie 35 do 70 jelit wszy zakażonych. Świnki te zakażone następnie po 17 dniach wirusem pasażowym nie zagorączkowały. Również małpa (*Macacus sinicus*) zaszczipiona 70 jelitami wszy zakażonych nie zachorowała po zakażeniu. Kligler, Olitzki i Aschner (17) uzyskali również pozytywne wyniki szczepiąc świnki formolizowaną zawiesziną roztartych jelit wszy zakażonych; podobnie dobre wyniki uzyskali Zia, i Chao-Jen Wu (18), Mariani G. (19) i inni. Chrzanowski i Mosing (20) badając szczepionkę uzyskaną z kału wszy zakażonych stwierdzili jej własności uodparniające na dużym materiale zwierzęcym ho wynoszącym około 250 świnek.

W wyniku tych badań, popartych spostrzeżeniami z terenu, przeprowadzano u nas szczepienia przeciw durowi plamistemu wyłącznie szczepionką weigłowską nie stosując szczepionek przygotowywanych innymi metodami i używanych w innych państwach. W okresie wojennym jednak wybuch dużych epidemii duru plamistego zwiększył zapotrzebowanie na szczepionkę. Powstały duże trudności zaopatrzenia się w dobrą szczepionkę sporządzoną według metody Weigla, bowiem władze okupacyjne przejęły prawie całkowicie jej produkcję i tylko niewielkie ilości udawało się uzyskać na potrzeby ludności polskiej.

Zaczęto wtedy stosować szczepionki pochodzenia zagranicznego, które w niewielkich ilościach przedostawały się do nas głównie z Francji, Szwajcarii i Ameryki. Szczepionki te były sporządzone z płuc myszy białych (ewentualnie króli) zakażanych zarazkiem duru plamistego europejskiego przez drogi oddechowe, według metody Castanedy i Durand-Giroud. W późniejszym okresie okupacji, sanitarne władze okupacyjne rozpoczęły szczepienia ludności szczepionką sporządzoną według metody Cox'a z pęcherzyków żółtkowych zarodka kurzego, zakażonego zarazkiem duru plamistego. Szczepienia te miały jednak charakter doświadczalny.

Z piśmiennictwa dostępnego w tym okresie wynika, że Cox i Bell (21) podjęli próby ze szczepionką jajową na dużym materiale zwierzęcym. Uzyskali

oni całkowite uodpornienie u $\frac{4}{5}$ szczepionych świnek. Dobre wyniki na świnkach uzyskali stosując tę szczepionkę Tchang i Mathews (22) oraz Otto i Bickhardt (23).

Szczepionka t.zw. płucna dawała również według Durandá i Giroud (24) oraz Giroud (25) zupełne uodpornienie świnek po wielokrotnym jednak szczepieniu. Dobre wyniki uzyskali oni zarówno ze szczepionką z płuc mysich jak i króliczych. Potwierdzili uodporniające działanie szczepionki tego typu Combiescu, Zotta, Manculescu, Pop i Tascu (26) oraz Otto i Bickhardt (23).

Wobec pojawienia się na naszych terenach nowych typów szczepionek koniecznym było sprawdzenie ich własności uodporniających w stosunku do zarazka duru plamistego, występującego u nas. Badania w tym kierunku podjąłem w roku 1942 prowadząc je, w miarę jak otrzymywałem nowe porcje szczepionek; opierają się one głównie na doświadczeniach z uodpornianiem świnek¹⁾, a tylko niewielka ich ilość mogła być przebadana na ludziach (badania te ograniczyły się jednak tylko do spostrzeżeń serologicznych).

Przebieg badania szczepionek na świnkach:

Dla stworzenia sobie dokładnego obrazu reagowania świnek morskich na szczepionkę przeciw durowi plamistemu, przeprowadziłem najpierw uodpornianie szczepionką wzorcową. Była to szczepionka przygotowana według metody Weigla; zawierała ona 3 szczepy Ricettsii prowazeki, wyodrębnione w Warszawie (2 szczepy) i z wojew. lubelskiego (1 szczep). Pełna dawka tej szczepionki zawierała 100 jelit wszy dobrze zakażonych, zawieszonych w 0,5% fenolu na roztworze fizjologicznym soli kuchennej.

Próbie uodporniania przeprowadziłem na 15 świnkach, dobranych mniej więcej pod względem wagi (300—400 gramów). Przed szczepieniem pobrano każdej śwince krew i sprawdzono na odczyn zlepnny z Ricettsią prowazeki. Odczyn ten wykonywano mikrometodą w kropli wiszącej. Zawiesinę aglutynacyjną sporządzono z jelit wszy zakażonych metodą Weigla. Odczyn ten nastawiany od rozcieńczenia 1:10 wypadł u wszystkich świnek ujemnie. Teraz przystąpiono do szczepienia, które wykonano w ten sposób, że I-szą grupę, złożoną z 5 świnek, zaszczepiono podskórną $\frac{1}{4}$ dawki szczepionki, wstrzykując co 5-ty dzień wzrastające dawki: 5, 8 i 12 jelit. Przez cały ten

¹⁾ Ogółem zużyłem do tych badań ponad 200 świnek; w pracy niniejszej jednak podaję wyniki badań tylko na 127 świnkach, reszta bowiem protokółów badań zaginęła w czasie powstania warszawskiego.

okres szczepienia mierzono świnikom temperaturę. II-gą grupę złożoną również z 5 świnek zaszczepiono $1\frac{1}{2}$ dawki ludzkiej, mianowicie 10, 15 i 25 jelit; a w III-ciej grupie składającej się także z 5 świnek wstrzyknięto trzykrotnie podskórnice: 20, 30 i 50 jelit, czyli pełną porcję stosowaną zwykle u ludzi. Świnki zniosły szczepienie dobrze, temperatura ich, mierzona w tym czasie nie przekraczała 39°C . Po upływie 14 dni od ostatniego szczepienia pobrano powtórnie krew od wszystkich świnek i wykonano ponownie odczyn zlepnny z Rickettsią prowazeki. W I-szej grupie świnek, u trzech wystąpiło miano 1:40, a u dwóch miano 1:20; w II-giej grupie stwierdzono u trzech świnek miano 1:80, a u dwóch miano 1:160; w III-ciej zaś grupie u dwóch świnek miano 1:160, a u trzech 1:320. W następnym dniu po pobraniu krwi t.j. w 15-tym dniu po ostatnim szczepieniu, zakażono wszystkie świnki dootrzewnowo wirusem pasażowym duru plamistego. Wirus ten, przeprowadzany uprzednio przez szereg miesięcy ze świnki na świnkę, stale dawał typowy obraz zakażenia durowego, a mianowicie okres wylegania wynosił niezmiennie 6 dni, w 7-mym dniu wznosiła się temperatura z reguły do 40°C , a nawet wyżej; gorączka na tej wysokości utrzymywała się 8—9 dni i następnie spadała krytycznie poniżej 39°C . Do zakażenia zaszczepionych świnek używałem stale dużej dawki wirusa pasażowego, mianowicie $1/_{20}$ część mózgu świnki znajdującej się w 4-tym dniu gorączki.

Dawka $1/_{20}$ mózgu pasażowego stanowi około 250—300 dawek zakażających dla świnki. Spostrzeżenia bowiem z wirusem pasażowym, użytym do powyższych doświadczeń, wykazały, że dawki $1/_{5000}$ — $1/_{6000}$ mózgu wstrzyknięte dootrzewnowo wywoływały jeszcze typowy obraz zakażenia u świnki.

Przy stosowaniu 250—300 dawek zakażających zachodzi słuszną obawę, że można przełamać nabytą odporność. Weigl (27) jest zdania, że nawet przebycie przez świnkę duru plamistego nie pozostawia u niej absolutnej odporności; odporność ta jest ograniczona i zawsze może być przełamana. Autor ten podaje wypadki, gdzie po 3—15 miesiącach od 1-szego zakażenia udało się świnki ponownie zakazić. Podobne spostrzeżenia uczynili Tahahashi i Hoshisaki (28), którzy są zdania, że zupełna odporność po przebyciu duru utrzymuje się u świnek tylko do 80 dni a później można ją przełamać dużymi dawkami zarazki: na 46 świnek rekonwalescentek zareagowało 10 ponowną gorączką po powtórным zakażeniu. Breinl (29) jest także zdania, że świnki można ponownie zakazić po 8—12 miesiącach od 1-szego zakażenia.

Z drugiej strony jednak wielu autorów podkreśla stałość odporności u świnek rekonwalescentek po durze plamistym. Świnki szczepione zabitym zarazkiem również uzyskują duży stopień odporności i nie reagują na duże

Tablica I.
Przebieg uodporniania świnek morskich wzorcową szczepionką weiglewską.

Ilość świnek użytych	Wysokość dawki szczepiennej. Szczepiono podskórnice co 5 dni	Miano zlepane z rick. prowarezki w 14 dniu po szczepieniu	Przebieg zakażenia dokonanego w 15 dniu po szczepieniu Dawka zakażająca: $\frac{1}{30}$ mózgu pasażowego	Miano zlepane z rick. prow. po spadku gorączki (ewent. po 20 dniach)	Świnki kontrolne
5 świnek	$\frac{1}{4}$ pełnej dawki I dawka: 5 jelit	1 świnka 1:40	{ nie zachorowały { zachorowała po 9 dniach wylęgania; gor. 4 dni { zachorowały typowo	1:40	2 Świnki zachorowały typowo. Miano zlepane z rick. prowarezki wyniosło po spadku gorączki: 1:640 i 1:1280
	II " 8 "	2 " 1:40		1:40	
	III " 12 "	3 " 1:40		1:160	
		4 " 1:20		1:640	
		5 " 1:20		1:1280	
5 świnek	$\frac{1}{2}$ pełnej dawki I dawka: 10 jelit	1 świnka 1:80	Świnki nie zachorowały.	1:80	
	II " 15 "	2 " 1:80		1:80	
	III " 25 "	3 " 1:80		1:80	
		4 " 1:160		1:80	
		5 " 1:160		1:80	
5 świnek	Pełna dawka ludzka: I dawka: 20 jelit	1 świnka 1:160	Świnki nie zachorowały.	1:160	
	II " 30 "	2 " 1:160		1:160	
	III " 50 "	3 " 1:320		1:320	
		4 " 1:320		1:320	
		5 " 1:320		1:320	

Tablica 2.
Przebieg uodpornienia świnek morskich kontrolowanymi szczepionkami sporządzonymi z wszy zakaźnych.

Data	Rodzaj szczepionki	Ilość świnek szczepionych	Dawka szczepionki. Szczepienie podskórne co 5 dzień	Miano zlepane z rick. prow. w 12 dniu po szczepieniu	Przebieg zakażenia dokonanego dootrzewnowo dawką $\frac{1}{100}$ mózgu pasażowego w 14 dniu po szczepieniu	Miano zlepane z rick. prow. po spadku gorączki (ewent. po 20 dniach)	Świnki kontrolne
2. VI. 1942	Szczepionka z wszy sporz. przez autora Ser. 1.	2	pełna dawka	1 : 160 1 : 160	świnki nie zachorowały	1 : 80 1 : 80	Zachorowały typowo. Agl. rick. 1 : 1280 1 : 1280
		2	$\frac{1}{2}$ dawki	1 : 80 1 : 160	świnki nie zachorowały	1 : 80 1 : 160	
		2	$\frac{1}{4}$ dawki	1 : 20 1 : 40	świnka zachor. typowo świnka chorowała 3 dni	1 : 640 1 : 160	
1. VIII 1942	Szczepionka jak wyżej Ser. 2	4	pełna dawka	1 : 80 1 : 80 1 : 160 1 : 160	świnki nie zachorowały	1 : 40 1 : 40 1 : 80 1 : 40	Zachorowały typowo. Agl. 1 : 1280 1 : 640
		1	$\frac{1}{2}$ dawki	1 : 40		1 : 80	
12 XII 1942	Szczepionka jak wyżej Ser. 3.	2	pełna dawka	1 : 160 1 : 320	świnki nie zachorowały	1 : 80 1 : 160	Zachorowały typowo. Agl. 1 : 1280 1 : 1280
		1	$\frac{1}{3}$ dawki	1 : 20	świnka zachor. typowo	1 : 320	
10. X 1942	Szczepionka Sanbakt Lwów Ser. 338.	2	$\frac{2}{3}$ dawki	1 : 40 1 : 80	świnki nie zachorowały	1 : 40 1 : 40	Zachorowały typowo. Agl. 1 : 1280 1 : 1280
		1	$\frac{1}{3}$ dawki	1 : 20	świnka zachor. typowo świnka zachorowała po inkub. 10 dni i gorączkowała 6 dni	1 : 320 1 : 80	
"	Szczepionka O K. H. Lwów	1	pełna dawka	1 : 40			

s. d. Tabl. 2.

26. X. 1942	Szczep. przysł. przez Dra Mosinga Ser. 1.	1	$\frac{1}{2}$ dawki	1:40	świnka zachor. typowo	1:1280	Zachorowały typowo. Agl. rick. 1:1280 1:2560
		3	pełna dawka	1:80 1:80 1:160	świnki nie zachorowały	1:40 1:40 1:80	
"	Szczep. przysł. przez Dra Mosinga (sproszkowaną)	3	pełna dawka	1:20 0 0	świnki zachor. typowo (9 dni gor.)	1:160 1:320 1:320	
"	Szczep. Zakł. prof. Bujwida Ser. 18.	3	pełna dawka	1:40 1:40 1:80	świnka chorowała 4 dni świnki nie zachorowały	1:160 1:40 1:40	
"	Szczep. P Z H Wohlrab Ser. 3.	3	pełna dawka	1:20 1:40 1:40	świnka chorow. typowo świnka chorowała 5 dni świnka nie zachorowała	1:160 1:80 1:20	
27. I. 1944	Szczep. przysł. przez Dra Mosinga Ser. 2.	2	$\frac{1}{2}$ dawki	1:40 1:40	świnki nie zachorowały	1:80 1:40	Zachorowały typowo. Agl. rick. 1:1280 1:1280
		2	pełna dawka	1:80 1:80		1:80 1:40	

Tablica 3.

Przebieg uodporniania świnek morskich kontrolowanymi szczepionkami sporządzonymi z woreczków żółtkowych zakażonych zarodków kurzych w/g Coxa.

Data	Rodzaj szczepionki	Ilość świnek szczepionych	Dawka szczepionki. Szczepienie podskór. co 5 dni	Miano zlepie z rick. prow. w 12 dni po szczepieniu	Przebieg zakażenia po wprowadzeniu dootrzewnym 1/20 móżgu pasażowego w 14 dniu po szczepieniu	Miano zlepie z rick. prow. po spadku gorączki (ewent. po 20 dniach)	Świnki kontrolne
29. V. 1942	Szczep. jajowa P.Z.H. Wohrab Ser. 4.	3	1/2 dawki	1:20	świnki zachorowały typowo	1:640	Zachorowały typowo Agl. 1:1280 1:640
				0		1:640	
				0		1:640	
		3	pełna dawka	0		1:1280	1:1280
				0		1:640	
1. VIII. 1942	Szczep. jajowa P.Z.H. Wohrab Ser. 5.	2	pełna dawka	0	świnki zachorowały typowo	1:1280	
				0		1:640	
				0		1:640	
		4	podwójna dawka	0		1:640	Zachorowały typowo Agl. rick. 1:1280 1:1280
				0		1:1280	
1. VIII. 1942	Szczep. jajowa P.Z.H. Wohrab Ser. 6.	1	pełna dawka	0	świnka zachor. typowo	1:640	
				0		1:40	
				0		1:640	
		5	podwójna dawka	0	świnka zachor. nietypowo	1:1280	1:640
				0		1:1280	

c. d. Tabl. 3.

10. X. 1942	Szczep. jajowa P.Z.H. Wohrab Ser. 7.	1 2	pełna dawka podwójna dawka	0 0 0	świnki zachorowały typowo	1: 640 1: 1280 1: 1280	Zachorowały typowo Agl. rick. 1: 1280 1: 1280
4. XII. 1942	Szczep. jajowa P.Z.H. Wohrab Ser. 8.	1 2 1	pełna dawka podwójna dawka 5-ciokrotne szczepienie w sumie: 5,5 ccm	0 0 0 1: 10	świnki zachorowały typowo	1: 640 1: 1280 1: 640 1: 320	Zachorowały typowo Agl. rick. 1: 640 1: 1280
12. XII 1942	Szczep. jajowa P.Z.H. Wohrab Ser. 9.	1 1	pełna dawka podwójna dawka	1: 10 1: 20	świnki zachorowały typowo	1: 1280 1: 640	Zachorowały typowo Agl. 1: 1280
16. II. 1943	Szczep. jajowa P.Z.H. Wohrab Ser. 10.	1 2 2	pełna dawka podwójna dawka 5-ciokrotne szczepienie w sumie: 6,5 ccm	1: 10 0 1: 10 1: 10	świnki zachorowały typowo	1: 320 1: 640 1: 640 1: 320	Zachorowały typowo Agl. rick. 1: 12-0 1: 640
8. III. 1943	Szczep. jajowa P.Z.H. Wohrab Ser. 11.	2	podwójna dawka	1: 10 1: 10	świnki zachorowały po 12-dniowej inkubacji. Gorączka trwała 4 dni	1: 640 1: 320	Zachorowały typowo Agl. rick. 1: 1280 1: 1280

T a b l i c a 4.

Przebieg uodparniania świnek morskich kontrolowanymi szczepionkami sporządzonymi z płuc myszy
(met Castaneda i Durand-Giroud).

Data	Rodzaj szczepionki	Ilość świnek szczepio- nych	Dawka szczepionki. Szczepienie pod skórą co 5 dni	Miano zlepane z rick. prow. w 12 dniu po szczepieniu	Przebieg zakażenia po wpro- wadzeniu dootrzewnowym $\frac{1}{320}$ móżdgu pasażowego w 14 dniu po szczepieniu	Miano zlepane z rick. prow. po spadku gorączki (ewent po 20 dniach)	Świniki kontrolne
27 I. 1944	Szczepionka Castaneda Meksyk I. porcja.	3	pełna dawka ludzka	1 : 20 1 : 20 0	świniki zagorączkowały typowo	1 : 320 1 : 160 1 : 320	Zachorowały typowo Agl. rick. 1 : 640 1 : 320
22 IV 1944	Szczepionka Castaneda Meksyk II. porcja	2 1	pełna dawka ludzka poćwójna dawka ludzka	0 1 : 10 0	świniki zachorowały typowo	1 : 320 1 : 640 1 : 320	Zachorowały typowo. Agl. rick. 1 : 640 1 : 640
8. III 1944	Szczepionka „Berna” prof. Hallauer	3	pełna dawka ludzka	1 : 20 1 : 40 1 : 40	świnika zachorowała typowo po 8 dniach inkubacji	1 : 640 1 : 640 1 : 640	Zachorowały typowo Agl. rick. 1 : 640 1 : 1280

nawet dawki zarazka żywego. Część autorów stosowała przy zakażaniu świnek szczepionych, w celu stwierdzenia ich odporności małe dawki zarazka żywego np. Nicolle i Sparrow (30), stosowali 10—50 dawek zakażających, Breinl (31) 50 dawek, Anigstein i Amzel (32) 50—60 dawek, podobnie Combiescu (33), Otto i Wohlrab (34), Otto i Bickhardt (35), i wielu innych. Inni znówu zas osowali do kontroli szczepionki duże dawki zarazka żywego np. Kemp (33) 200 dawek zakażających, Kligler, Olitzki i Aschner (37) 200 dawek zakażających, Zinsser i Castaneda (38) 100 250 dawek zakażających. Kurotchin i Wyckoff (39) 1000 dawek zakażających, podobnie Giroud i Panthier (40).

Równocześnie z świnkami szczepionymi wzorcową szczepionką zakażono dwie świnki kontrolne taką samą dawką zarazka. Otrzymane wyniki są zestawione na tablicy 1. W I-szej grupie zachorowały dwie świnki (które wykazały miano aglutynacyjne z rickettsią prowazeki 1:20) równocześnie ze świnkami kontrolnymi wykazując typowy przebieg duru plamistego. Krew, pobrana od nich w następnym dniu po spadku gorączki, wykazywała miano zlepne dla Rickettsii prow. 1:640 i 1:1280; te same miana osiągnęły świnki kontrolne. Z dalszych trzech świnek tej grupy dwie nie zachorowały (temperaturę mierzono do 30-go dnia po zakażeniu); miano zlepne dla Rickettsii prow. utrzymało się na poprzednim poziomie. Zaś piąta świnka zachorowała po 9-ciu dniach wylegania, wykazując czterodniową niezbyt wysoką gorączkę; miano zlepne po spadku gorączki podniosło się do 1:160. Świnka ta przeżyła zatem bardzo lekki dur plamisty.

U pozostałych 10-ciu świnek z grupy II-giej i III-ciej nie zaobserwowano w ciągu 30-tu dni po zakażeniu podniesienia się temperatury powyżej 39°C. Miano zlepne dla Rickettsii prow. skontrolowane w 20-tym dniu po zakażeniu, odpowiadało mianu poszczepiennemu, a nawet u dwu świnek nieco spadło. Wszystkie więc świnki tych grup okazały się odpornymi na zakażenie 250—300 dawkami zakażającymi.

Wynik badania szczepionki weiglowskiej wzorcowej pozwala nam przyjąć, że już połowa dawki stosowanej u ludzi (50 jelit) wystarcza, aby uodpornić świnki morskie na zakażenie dużą dawką zarazka żywego. Zaszczepienie świnek pełną dawką szczepionki daje w wyniku nie tylko uodpornienie ale również wywołuje znaczny wzrost aglutynin dla Rickettsii prowazeki. Dawki, wynoszące $\frac{1}{4}$ stosowanej u ludzi (25 jelit), nie dają już u świnek pewnego efektu odpornościowego po zakażeniu ich dużą dawką zarazka żywego; również miano zlepne dla Rickettsii prowazeki w surowicy tych świnek osiąga wartości niskie, najwyżej 1:40.

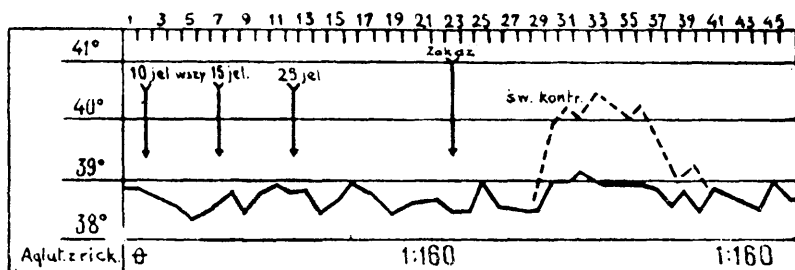
Po przebadaniu szczepionki wzorcowej można było przystąpić do porównawczej kontroli szczepionek znajdujących się w obiegu wśród ludności. Załączone tablice 2, 3 i 4 obrazują nam przebieg i wyniki kontroli własności uodporniających dla świnek morskich trzech typów szczepionek przeciw durowi płamistemu, które trafiły do moich rąk w czasie od maja 1942 roku do kwietnia roku 1944. Należą tu szczepionki sporządzone według metody Weigla dostarczone ze Lwowa przez Dra Mosinga, następnie wyprodukowane w pracowniach niemieckich we Lwowie (O.K.H.), i w Warszawie (Wohlrab), dalej szczepionka z Zakładów prof. Bujwida w Krakowie i wreszcie szczepionka sporządzana w Warszawie przez autora. Szczepionka „jajowa“ wg. Coxa, której przebieg badania jest uwidoczniiony na tablicy 3-ciej, pochodziła z pracowni niemieckiej P.Z.H. w Warszawie (Wohlrab). Szczepionki „płucne“ wg. Castanedy i Durand-Giroud pochodziły z Meksyku (Castaneda) oraz z Szwajcarii (Berna)¹⁾.

Ogółem ujmują podane tablice wyniki badania 10-ciu różnych serii szczepionki weigłowskiej na 35-ciu świnkach morskich z 12-tu świnkami kontrolnymi; dalej przebieg badania 8-miu serii szczepionki „jajowej“ na 34-rech świnkach z 14 kontrolnymi i 3 serie szczepionki „płucnej“ przebadanej na 9 świnkach z 6 kontrolnymi.

Poniżej podaję krzywe gorączkowe niektórych świnek uodpornianych wspomnianymi szczepionkami:

Tablica 5.

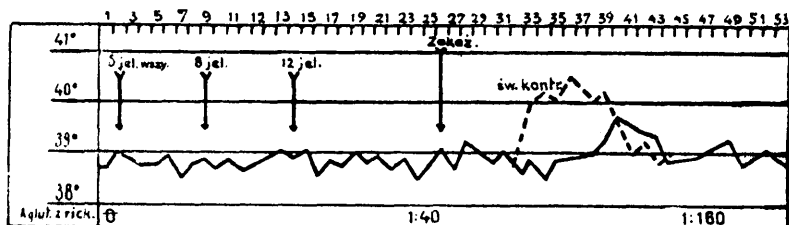
Świnka Nr 15 zaszczipiona 1/2 dawki szczep. wzorcowej:



¹⁾ Oprócz wyżej podanych szczepionek został przekontrolowany cały szereg innych szczepionek jak np. szczepionki „płucne“ przysłane mi łaskawie przez prof. Weigla ze Lwowa, szczepionka Durand-Giroud z Paryża, szczepionka Moosera z Szwajcarii i inne. Z powodu zaginięcia protokołów badania tych szczepionek nie mogę w niniejszej pracy przytoczyć oceny ich własności uodporniających.

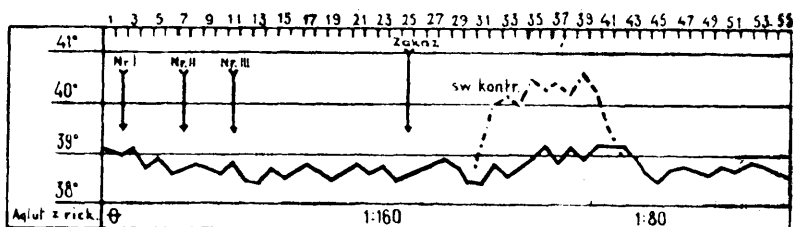
Tablica 6.

Świnka Nr 11 zaszczipiona $\frac{1}{4}$ szczep. wzorcowej weigłowskiej:



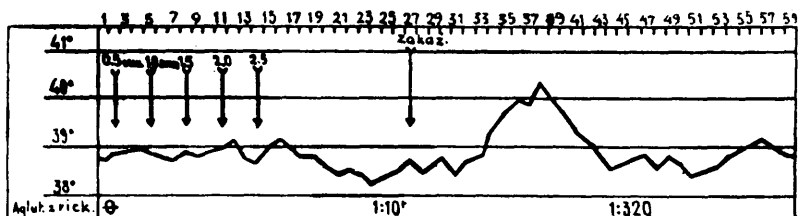
Tablica 7.

Świnka Nr 79 zaszczipiona pełną dawką szczep. Dra Mosinga.



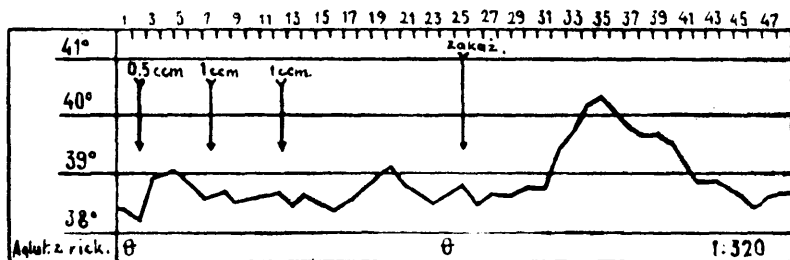
Tablica 8.

Świnka Nr 91 zaszczipiona wielokrotnie szczep. jajową ser. 8.



Tablica 9.

Świnka Nr. 139 zaszczipiona pełną dawką szczep. płucnej (Castanedy).



Wnioski.

Wyniki badania szczepionek przygotowanych z jelit wszy, zakażonych według metody Weigla, na ogół zgadzają się z wynikami, otrzymanymi po zastosowaniu szczepionki wzorcowej. Wyjątek stanowi szczepionka „sproszkowana“, przyślana przez Dra Mosinga, która nie wywołała uodpornienia u świnek, ani też nie podniosła u nich miana zlepnego dla Rickettsii prowazeki. Szczepionka z Zakładów prof. Bujwida, warszawska Wohlrabailwowska O.K.H. dały wyniki, zbliżone do podanych w tablicy 1 dla $\frac{1}{4}$ dawki szczepionki wzorcowej. Prawdopodobnie nie zawierały one w porcji jednostkowej 100 jelit wszy zakażonych, lecz znacznie mniej, albo też wszy, użyte do szczepionki, nie były dostatecznie zakażone Rickettsią prowazeki. Przy ocenie szczepionek weiglowskich zwraca uwagę fakt, zgodnie ze spostrzeżeniami Mariana'ego oraz Chrzanowskiego i Mosinga, że zawartość aglutynin dla Rickettsii prowazeki w surowicy świnek szczepionych idzie do pewnego stopnia równolegle ze stopniem uodpornienia na zakażenie. Jeżeli miano zlepne wynosiło $\frac{1}{10}$ lub 1:20, wtedy dawka $\frac{1}{20}$ mózgu pasażowego wywoływała u świnek zakażenie o przebiegu typowym dla duru plamistego, nie różniącym się od przebiegu duru u świnek kontrolnych nieszczepionych. Miano 1:80 lub wyższe dowodziło uodpornienia świnek, którego nie przełamывała duża dawka zarazka żywego wynosząca 250—300 dawek zakażających. Natomiast, jeżeli miano zlepne dla Rickettsii prowazeki wynosiło 1:40, część świnek nie ulegała zakażeniu, część zaś wykazywała zakażenie o przebiegu krótszym przy wydłużeniu się okresu wylegania, lub chorowały typowo. Z tablicy 1 i 2 wynika, że na 14 świnek, które wykazały miano poszczepienne 1:40, 8 świnek nie uległo zakażeniu, 5 świnek przebyło dur skrócony (gorączka utrzymywała się 3—6 dni i nie osiągała 40°C), a 1 świnka przebyła typowy dur plamisty nie różniący się przebiegiem od duru u świnek kontrolnych. Nasuwa się więc wniosek, że miano zlepne 1:40 jest wartością graniczną, powyżej której świnki wykazują zupełną odporność.

Przechodząc do omówienia szczepionki „jajowej“ sporządzonej z pęcherzyka żółtkowego, zakażonego zarodkiem kurzego w Warszawie (P. Z. H. Wohlrab), musimy stwierdzić jej zupełny brak własności uodporniających przeciw durowi plamistemu u świnek morskich. Jak wynika z tablicy 3, na 34 świnki szczepione pełnymi dawkami, dawkami podwójnymi

lub nawet wielokrotnie większymi, żadna nie była odporna na zakażenie wirusem pasażowym. Trudno jest wyjaśnić przyczynę tego zjawiska; można tylko wysuwać przypuszczenia, że szczepionka ta zawierała za mało właściwego antygeny uodparniającego, albo też zarazek w niej zawarty uległ zmianom tak daleko idącym, że nie był w stanie wywołać przeciwciał u świnek.

W ostatnich czasach doszły mnie wiadomości, że szczepionka „jajowa“ sporządzana w Ameryce wykazuje wybitne własności uodparniające. Szczepionka ta w stosunku do omawianej wyżej jest lepiej oczyszczona i stężona.

Trzeci rodzaj szczepionek przeciw durowi plamistemu t. zw. szczepionki „płucne“, przebieg badania których jest uwidoczniiony na tablicy 4 jest reprezentowany w niniejszej pracy przez szczepionkę Castanedy (Meksyk) oraz szczepionkę szwajcarską „Berna“. Szczepionka Castanedy nie wywołała uodpornienia świnek przeciw durowi klasycznemu, natomiast szczepionka szwajcarska wywołała pewne uodpornienie, aczkolwiek niezbyt silnie wyrażone¹⁾.

BADANIA SEROLOGICZNE U LUDZI SZCZEPIONYCH

Dla uzyskania pełnego obrazu wartości badanej szczepionki należałoby porównać wyniki uodparniania świnek z wynikami uodparniania ludzi. Tego rodzaju badania były jednak niemożliwe do przeprowadzenia w okresie okupacji. Udało się jedynie przeszczepić pewną liczbę osób niektórymi seriami szczepionki weigłowskiej, uznanej za dobrą, na zasadzie badania na świnkach morskich. U osób tych sprawdzałem miano aglutynacyjne dla Rickettsii prowazeki i odmienia OX₁₉ przed szczepieniem i po 14 dniach od ostatniego zastrzyku szczepionki.

Badania serologiczne u ludzi szczepionych szczepionką weigłowską przeprowadzali Liu, Zia i Wang (41). Stwierdzili oni na materiale z 121 osób badanych $\frac{1}{3}$ —14 miesięcy po szczepieniu, że miano aglutynacyjne dla Rickettsii prow. i odmienia OX₁₉ wynosiło przeważnie 1:20 do 1:40 (tylko w 2 wypadkach miano agl. z rickettsiami wynosiło 1:320). Nie zauważyli oni równoległości między aglutynacją z rickettsiami a odczynem Weil-Felixa np. miano dla rickettsii mogło wynosić 1:320 a dla OX₁₉ 1:10. Przy tym aglutyniny dla rickettsii ginęły szybciej niż dla OX₁₉. Również Matthews (9) stwierdza, że aglutynacja z rickettsiami u szczepionych szczepion-

¹⁾ Oprócz szczepionek „płucnych“ wyżej wymienionych, sprawdzałem własności uodparniające nadesłanej mi przez prof. Weigla i paryskiej szczepionki tego typu. Obie te szczepionki dały w doświadczeniu na świnkach morskich dobre wyniki. Protokoły tych badań jednak zaginęły.

ką weiglowską zawsze wypada dodatnio, podczas gdy odczyn Weil-Felixa może być nawet ujemny. Goeters (12) znalazł tylko u $\frac{1}{3}$ szczepionych dodatni odczyn Weil-Felixa o mianach 1:100 do 1:200. Minkiewicz (43) uważa, że dodatni odczyn Weil-Felixa nie świadczy u ludzi o odporności przeciw durowi plamistemu i przytacza dla przykładu, że w 5 wypadkach ludzi z dodatnim odczynem Weil-Felixa 1:100 wystąpił po 2-4 tygodniach typowy dur plamisty.

Na 827 zaszczepionych osób różnymi seriami szczepionki weiglowskiej udało mi się przeprowadzić badanie serologiczne przed i w 14 dniu po szczepieniu u 638 osób, natomiast u 189 osób tylko w 14 dniu po szczepieniu. Wyniki tych badań są uwidocznione w tabelce 10¹⁾.

T a b l i c a 10.

Wyniki badania krwi przed i w 14 dniu po szczepieniu u 638 szczepionych osób

Rodzaj szczepionki		Szczepionka O. K. H. Lwów Szczepionka O. K. H. Kraków				Szczepionka Mosing Seria 1 i 2			
Ilość osób szczepionych		218				292			
Odczyn		Weigla (agl. z rick.)		W—Felixa		Weigla (agl. z rick.)		W—Felixa	
		przed	po	przed	po	przed	po	przed	po
		‰		‰		‰		‰	
Ujemny		19,1	0	19,7	19,7	16,5	0,7	31,5	21,2
Dodatni	1 : 10	22,5	0	25,2	22,4	20,2	0	29,8	21,9
	1 : 20	36,2	3,6	31,7	17,4	32,5	5,1	22,6	24,3
	1 : 40	14,2	14,7	15,2	20,2	22,9	18,8	9,6	19,5
	1 : 80	13,3	42,7	5,9	14,2	5,5	40,4	4,8	10,3
	1 : 160	4,6	31,6	1,8	5,5	2,4	30,5	1,7	2,0
	1 : 320	0	7,3	0,4	0,4	0	4,4	0	0,7
średnie miano		1 : 33,3	1 : 14,9	1 : 24,0	1 : 35,4	1 : 25,9	1 : 17,9	1 : 95,7	1 : 28,1

¹⁾ Materiał do badań serologicznych uzyskałem w większości dzięki uprzejmości ś. p. prof. Dra Ławrynowicza.

Tablica 11.

Rodzaj szczepionki		Szczepionka sporządzona przez autora							
Ilość osób szczepionych		Seria 1				Seria 2 i 3			
Odczyn		45				83			
		Weigla (agl. z rick.)		W—Felixa		Weigla (agl. z rick.)		W—Felixa	
		przed	po	przed	po	przed	po	przed	po
		‰		‰		‰		‰	
Ujemny		13,3	0	35,5	42,2	4,8	0	24,1	2,4
Dodatni	1 : 10	26,7	0	31,1	37,8	9,6	0	4,8	13,3
	1 : 20	26,7	2,2	17,8	11,1	35,0	2,4	37,3	25,3
	1 : 40	22,2	24,4	8,9	4,4	38,4	6,0	24,1	36,1
	1 : 80	8,9	48,9	6,6	4,4	12,1	36,1	9,6	14,4
	1 : 160	2,2	24,4	0	0	0	38,5	0	8,4
	1 : 320	0	0	0	0	0	16,9	0	0
średnie miano		1 : 27,5	1 : 88,5	1 : 15,5	1 : 11,3	1 : 33,0	1 : 47,4	1 : 25,3	1 : 45,9

Tablica 12.

Wyniki odczynów zlepných u ludzi, którym pobrano krew tylko po szczepieniu

Rodzaj szczepionki		Szczepionka Mosing Seria 1 i 2		Szczepionka sporządzona przez autora Seria 2 i 3	
Ilość osób szczepionych		129		60	
Odczyn		Weigla agl. z rick. ‰	W—Felixa ‰	Weigla agl. z rick. ‰	W—Felixa ‰
Miano	Ujemne	0	9,3	0	1,7
	1 : 10	0	13,9	0	18,3
	1 : 20	0,7	24,8	3,3	25,0
	1 : 40	19,4	27,1	8,3	33,3
	1 : 80	41,8	19,4	41,7	13,3
	1 : 160	34,1	4,7	33,3	8,3
	1 : 320	3,9	0,7	13,3	0
średnie miano		1 : 108,3	1 : 42,6	1 : 133,3	1 : 44,1

Z załączonych zestawień wynika, że u ludzi, szczepionych szczepionką dobrą, podnosi się wydatnie miano zlepnego dla rickettsii prowazeki. U ludzi spotykamy się nieraz ze zjawiskiem wysokiej aglutynacji przed szczepieniem, podczas gdy u świnek morskich bywa wtedy odczyn zlepnym ujemny. U ludzi więc należy się kierować w ocenie wyniku szczepienia nie absolutną wysokością miana zlepnego, lecz jego tendencją do podnoszenia się. Niewątpliwie część tych wysokich mian u ludzi należy odnieść do częstego stykania się ich z zarazkiem duru plamistego, co może mieć miejsce w czasie epidemii oraz w ogniskach endemicznych. Poza tym część mogła przebyć bardzo lekki dur plamisty nierozpoznany. Można by jeszcze wiązać wysokie miano zlepnego u ludzi nieszczepionych z nosicielstwem zarazki, jakkolwiek większość badaczy nie uznaje nosicielstwa w durze plamistym. Ocena szczepionki na podstawie wyniku aglutynacji z Rickettsią prowazeki może być miarodajna tylko po zestawieniu wyników dużej liczby szczepień.

Odczyn Weil-Felixa jak to widać z tablic 10 i 11 pojawia się w niedużym odsetku u ludzi szczepionych i nie wykazuje wysokich mian. Nie można również stwierdzić równoległości jego podnoszenia się wraz z odczynem zlepnym z rickettsiami. Opieranie się więc na tym odczynie jako sprawdzianie uodpornienia byłoby błędem; spotkałem się bowiem z przypadkami w 22,4% (143 wypadki), gdzie miano dla OX_{19} nie zmieniło się w ogóle po szczepieniu. W 206 przypadkach t.j. 32,2% miano dla OX_{19} nawet obniżyło się w stosunku do przedszczepiennego. Częste były wypadki, bo 48,7% (311 przypadków), gdzie wzrosło wybitnie po szczepieniu miano dla Rickettsii prowazeki, zaś miano dla OX_{19} nie wykazało zmian lub nawet obniżyło się. Wzrost miana dla rickettsii prowazeki zaznaczył się po szczepieniu u 91,1% (581 przypadków) szczepionych a tylko w 1,2% (8 przypadków) można było stwierdzić wzrost miana dla OX_{19} przy nie zmieniającym się mianie dla Rickettsii prowazeki; dotyczyło to przeważnie osób w podeszłym wieku i u wyniszczonych.

W N I O S K I K O Ń C O W E:

Kontrola wartości szczepionek przeciw durowi plamistemu w laboratoriach musi opierać się na metodzie uodparniania świnek morskich. Metoda ta jednak pochłania bardzo dużo czasu, przeciętnie około 6—7 tygodni. Opierając się na spostrzeżeniu, że miano aglutynacyjne dla Rickettsii prowazeki wzrasta u szczepionych świnek morskich równolegle

z odpornością, można by oprzeć się tylko na stwierdzeniu wysokości tego miana; wynik tego badania wraz z uwzględnieniem innych metod pomocniczych, jak: badanie mikroskopowe szczepionek oraz stwierdzanie zlepiania się rickettsii, zawartych w szczepionkach z surowicami odpornościowymi anti-rickettsiowymi (królików lub świnek morskich, zakażonych dudem płamistym albo ludzkich tyfusowych), powinno wystarczyć dla oceny danej serii szczepionki. Czas badania skraca się wtedy do 17—23 dni.

S T R E S Z C Z E N I E.

1. Połowa dawki (50 jelit) szczepionki sporządzonej z jelit wszy zakażonych wg. metody Weigla chroni świnki morskie przed zachorowaniem, nawet po zakażeniu ich dużą ilością zarazka żywego (250—300 dawkami zakażającymi).
2. U świnek szczepionych podnosi się w surowicy miano zlepne dla Rickettsii prowazeki i osiąga po wstrzyknięciu połowy dawki szczepionki przeważnie miano 1:80. Taka wysokość miana zlepnego oraz miano wyższe świadczą o uodpornieniu świnek.
3. W wypadku wystąpienia u świnek miana 1:40, część z nich jest odporna na zakażenie 250 dawkami zakażającymi a część ulega zakażeniu, przeważnie o przebiegu skróconym.
4. Szczepionka „jajowa“, wyprodukowana w okresie wojny w P. Z. H. Warszawa (pracownia Wohlraba), nie uodparniała świnek przeciw durowi płamistemu ani też nie podnosiła u nich miana zlepnego dla rickettsii prowazeki.
5. Szczepionka „płucna“ Castanedy (wyprodukowana w Meksyku) nie chroniła świnek przed zakażeniem dudem klasycznym, podnosiła u nich miano zlepne dla rickettsii prowazeki tylko nieznacznie, najwyżej do 1,20.
6. U ludzi szczepionych szczepionką weigłowską można było z reguły (u 91,1% szczepionych) wykazać podnoszenie się miana zlepnego dla Rickettsii prowazeki. Najczęściej miano to osiągało wartość 1:80, podczas gdy przed szczepieniem najczęstsze było 1:10 i 1:20.
7. Miano odczynu Weil-Felixa u szczepionych nie zawsze podnosi się (w 22,4% szczepionych nie zmieniło się, a u 32,2% nawet się obniżyło) i nie wykazuje równoległości z mianem dla Rickettsii prowazeki.

THE EVALUATION OF THE IMMUNIZING PROPERTIES OF THE EPIDEMIC TYPHUS VACCINES.

Different epidemic typhus vaccines have been investigated in guinea pigs (125).

The vaccines prepared by the Weigl's method (from infected louse intestines) protected the guinea pigs against infection after subcutaneous administration of $\frac{1}{2}$ human dose (50 intestines) even when guinea pigs were infected by 250—300 infectious doses ($\frac{1}{20}$ a brain taken from a guinea pig infected with a strain of epidemic typhus). Serums taken from the guinea pigs vaccinated with $\frac{1}{2}$ human dose of Weigl vaccine have shown the agglutination titre with *ri. prowazeki* 1:80 or higher. When vaccinated by means of a dose less than $\frac{1}{2}$ human dose the agglutination titre did not reach the value 1:80; in the cases of the agglutination titre 1:40 one part of the guinea pigs acquired the immunity, the other became infected, the illness however lasted not so long. When the agglutination titre was 1:20 all guinea pigs got a typical typhus infection.

The vaccine prepared from yolk sacs of chick embryos infected with epidemic typhus by German laboratory in Warsaw during the war gave neither the immunity to the guinea pigs nor agglutination phenomenon.

The vaccines prepared from mouse lungs infected with an epidemic strain of typhus virus produced by Castaneda in Mexico also did not protect the guinea pigs against classical typhus, have caused, however, agglutination titre usually up to 1:20. Better results have been obtained with Dr. Hallauer's mouse lung vaccine (Switzerland) which positively protected a part of guinea pigs against infection.

Among the people vaccinated by means of a properly prepared Weigl vaccine an increased agglutination titre with *ri. prowazeki* has been stated in 91,1 p. c.; mostly a titre 1:80 has been found (before vaccination the titre ranged 1:10—1:20).

The Weil-Felix agglutination titre among vaccinated people increased only in 45,4 p. c. of the cases, among other did not change or even diminished.

No correlation has been found between agglutination titre with *ri. prowazeki* and Weil-Felix reaction.

PIŚMIENNICTWO.

1. Weigl R.: Bull. de l'Acad. pol. des Sci. Cl. de Médec. 1930.
Weigl R.: Bull. de l'Acad. pol. des Sci. Cl. de Médec. Nr 25 1933.
Weigl R.: Arch. Inst. Pasteur Tunis 22. r. 1933.
2. Chodźko W.: Bull. mens. Off. internat. Hyg. publ. 25. r. 1933.
3. Palester: Warsz. Czasop. Lekarskie R v. r. 1933.
Palester: Min. d'Assist. sociale Warszawa 1935 r.
4. Radło P.: Arch. Inst. Pasteur Tunis 26. r. 1937.
5. Weigl R.: Klin. Wochenschr. Nr 35'33 r. 1921.
6. Gajdos i Tchang: Chin. med. Journ. 17. r. 1933.
7. Shahin Pacha M.: Bull. mens. Off. internat. Hyg. publ. 27. r. 1935.
8. Knack A.: Wien. Klin. Wochenschrift. II. r. 1937.
9. Mathews G.: Mil. arzt. 3. r. 1938.
10. Mariani G.: Ann. Igiene 49. r. 1939.
11. Herzig A.: Presse méd. r. 1939.
12. da Rocha-Lima: Münch. med. Wochenschrift r. 1918.
da Rocha-Lima: Med. Klinik Nr 43. r. 1917.
13. Dörr i Schnabel: Wien klin. Wochenschrift r. 1919.
14. Weigl R.: Arch. Inst. Pasteur Tunis 22. r. 1933.
15. Breinl Fr.: Med. Klinik Nr 4. r. 1924.
Breinl Fr.: Zschrft. f. Immun-forsch. 41. r. 1924.
16. Nicolle Ch. i Sparrow H.: Ann. Inst. Pasteur Tunis 22. r. 1932.
17. Kligler, Olitzki i Aschner: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 29. r. 1932.
18. Zia i Chao-Jen Wu: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 32. r. 1935.
19. Mariani G.: Ztschr. f. Hyg. u. Inf-krankh. 125. r. 1913.
20. Chrzanowski B. i Mosing H.: Arch. Inst. Pasteur Tunis 22. r. 1933.
21. Cox H. i Bell J.: Publ. Health Rep. r. 1940.
22. Tchang J. i Mathews G.: Chin. med. Journ. 58. r. 1940.
23. Otto R. i Bickhardt: Ztschr. f. Hyg. 123. r. 1942.
24. Durand i Giroud: C. r. Acad. Sci. Paris 210. r. 1940.
Durand i Giroud: Ann. Inst. Pasteur 66. r. 1941.
25. Giroud: C. r. Acad. Sci. Paris 214. r. 1942.
26. Combiescu, Zotta, Manculescu, Pop i Tascau: Ztschr. f. Hyg. 123. 1942.
27. Weigl R.: Med. Klin. r. 1924.
28. Tahahashi i Hoshisaki: Journ. of orient. Med. 13. r. 1930.
29. Breinl Fr.: Med. Klin. 19. Nr 50. r. 1923.
30. Nicolle Ch. i Sparrow H.: Ann. Inst. Pasteur Tunis 21. r. 1932.

31. Breinl Fr.: Ztschr. f. Immun.forsch. 41. r. 1924.
 32. Anigstein L. i Amzel R.: Zentrbl. f. Bakt. Orig. 115. r. 1930.
 33. Combiesco: C. r. Soc. Biol. Paris 124. r. 1937.
 34. Otto R. i Wohlrab R.: Ztschr. f. Hyg. 122. r. 1939.
 35. Otto R. i Bickhardt: Ztschr. f. Hyg. 123. r. 1942.
 36. Kemp: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 29. r. 1932.
 37. Kligler, Olitzki i Aschner: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 29. r. 1932.
 38. Zinsser H. i Castaneda: Journ. of exper. Med. 57. r. 1933.
 39. Kurotchin i Wyckoff: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 46 r. 1941.
 40. Giroud i Panthier: Ann. Inst. Pasteur 68. r. 1942.
 41. Liu, Zia i Wang: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 38. r. 1938.
 42. Goeters: Ztschr. f. Immun—forsch. 102. r. 1942.
 43. Minkiewicz: Gig. i Epidem. 9. Nr 10. r. 1930.
-

Z Miejskiego Instytutu Higieny w Warszawie

Kier.: Prof. A. Ławrynowicz

ZACHOWANIE SIĘ BAKTERIOFAGA DUROWEGO W ŚRODOWISKACH ZAKAŻONYCH PAŁECZKĄ DUROWĄ

ZENON BUCZOWSKI

I.

Występowanie bakteriofagów w kale zwierzęcym.

Z dotychczasowych badań wiadomo, że głównym źródłem bakteriofagów dla drobnoustrojów wywołujących schorzenia jelitowe lub stale w jelitach bytujących, jest kał ludzki i kał niektórych zwierząt. Ogólnie uważa się, że wydalenie bakteriofaga z jelit podlega często znacznym wahaniom. Kał tego samego osobnika badany w krótkich odstępach czasu, jednodziennych lub nawet jeszcze krótszych, może raz zawierać bakteriofaga w bardzo dużych ilościach, powtórnie zaś badany może wykazywać zaledwie jego ślady lub brak zupełny. Mogą też występować wahania jakościowe.

Jak wynika z prac Ohashi, istnieją wpływy pór roku zmieniające wydalenie bakteriofagów. Kura wydziela je obficie w lecie, w zimie bardzo niewiele lub wcale nie wydziela. Mechanizm zjawiska jest niejasny tymbardziej, że autor wyłącza okoliczności związane ze zmianą żywienia. Stwierdził on że pewne pokarmy i środki chemiczne pobudzają bardzo mocno wydalenie bakteriofagów u kury w lecie, w zimie natomiast te same sposoby wcale nie działają lub działają z minimalnym skutkiem.

U człowieka nie stwierdzono podobnej sezonowości.

Nosicielstwo bakteriofagowe u drobnoustrojów.

Wkrótce po odkryciu d'Herelle'a przekonano się, że bakteriofagi można wykazać również w hodowlach drobnoustrojowych.

Otto i Munter, stosując odpowiednie postępowanie, otrzymywali bakteriofagi w starych hodowlach drobnoustrojowych. Używali szczepów,

których hodowle nie wykazywały poprzednio obecności bakteriofagów. W doświadczeniach tych wystąpiły bakteriofagi w hodowlach durowych, w hodowlach czerwonej typu Y, Flexner i Shiga, pał. okrężnicy, paciorkowców i gronkowców.

Hadley opisuje szczep pał. ropy błękitnej, w którego hodowlach stwierdził obecność czynnika litycznego. Ulegały mu nawet drobnoustroje tego samego szczepu pał. ropy błękitnej.

Ten sam autor wraz z Jimenez obserwowali wystąpienie po pewnych zabiegach bakteriofaga w hodowli duru rzekomego A.

Fukuda otrzymywał bakteriofagi w hodowlach mieszanych różnych drobnoustrojów.

Gildemeister i Herzberg stwierdzili, że jeden z badanych przez nich szczepów pał. okrężnicy (Coli 88) wytwarza bakteriofagi działające na niektóre szczepy pał. typu Shiga.

Klieneberger zbadala 13 szczepów typu Kruse-Sonne i u wszystkich stwierdziła występowanie czynnika litycznego. Z jej doświadczeń wynika, że nie wszystkie szczepy dawały w hodowlach równomiernie i stale ten czynnik, lecz były także też które dla jego ujawnienia wymagały wielokrotnych badań w pewnych odstępach czasu. Ze wszystkich szczepów otrzymane bakteriofagi miały różne sposoby działania. Działały na szczepy hetero- i homologiczne, a po odpowiednim pasażowaniu i na własny.

Hoder i Akano badali w tym kierunku cały szereg drobnoustrojów i stwierdzili bakteriofagi w 5-ciu hodowlach z 25-ciu szczepów czerwonej typu E.

Gildemeister i Ahlfeld ostatnio, badali cały szereg drobnoustrojów na nosicielstwo bakteriofagowe. Do doświadczenia użyli oni po 10 szczepów pałeczek durowych, typów Schottmüller i Wrocław, duru rzekomego C i Gärtner'a. Bakteriofagi ujawnili w hodowlach 5-ciu szczepów durowych 8-miu typu Schottmüller, 10-ciu Wrocław, 8-miu duru rzekomego C i 1-go Gärtner. Bakteriofagi te działały w pierwszym rzędzie na grupę homologiczną, ale poza tym dość liczne i na grupy obce. Nieliczne tylko działały wyłącznie na grupy heterologiczne. Autorzy ci wyhodowali 10 szczepów pał. okrężnicy z 10-ciu prób kału ludzkiego. W każdej z tych prób stwierdzili poprzednio obecność bakteriofagów. Okazało się, że z tych 10-ciu szczepów pał. okrężnicy, u 8-miu wystąpiły w hodowlach bakteriofagi.

Wszystkie te prace dowodzą niezbicie, że wśród drobnoustrojów różnych grup chorobotwórczych i niechorobotwórczych zdarzają się dość często szczepy posiadające własnego bakteriofaga, który działa na drobnoustroje grup heterologicznych, homologicznych, czasem łączy to działanie, a jeszcze rzadziej działa na komórki drobnoustrojowe tego szczepu z którego gościny korzysta. Są to szczepy-nosiciele bakteriofaga.

Przyczyny występowania bakteriofagów w kale.

Jakkolwiek d'Herelle wykrył bakteriofagi w kale chorych na czerwonkę, to jednak szybko przekonano się i potwierdzono w wielu pracach, że często są one obecne również i w przewodach pokarmowych osób zdrowych. Co więcej, okazało się, że niektóre zwierzęta wydalają z kałem bakteriofagi dla takich drobnoustrojów, którymi nie mogą się zakazić, na które są niewrażliwe. Kura, która nie choruje na dur brzuszny, dury rzekome i czerwonki, ani też nie jest nosicielem odpowiednich drobnoustrojów, wydała bardzo często i bardzo obficie bakteriofagi dla tych grup. Zagadnienie obecności bakteriofagów w jelitach zwierząt było przedmiotem wielu badań.

Hoder i Toyoda badali na zawartość bakteriofagów jaja kurze, zarodki w różnych okresach rozwoju i młode sztucznie wyhodowane kurczęta. Do wykrycia działania litycznego użyli po jednym szczepie pał. durowej, duru rzekomego B, Gärtner'a, Shiga-Kruse, Flexner'a oraz pał. okrężnicy, przy czym ten ostatni miał być szczególnie wrażliwy na odpowiednie bakteriofagi. Zbadali 9 jaj świeżych oraz 13 jaj trzymanych w termostacie. Z tych 13 w różnych okresach pobierano próby. Troje kurcząt wylętych w czasie doświadczenia karmiono jałowym pokarmem, podając obok tego zabite lub żywe hodowle wymienionych szczepów. Autorzy nie wykazali żadnych bakteriofagów ani w jajach przed doświadczeniem, ani w czasie wylęgania. Również kał kurcząt przed karmieniem drobnoustrojami jak też i po karmieniu był wolny od bakteriofagów.

Hoder wraz z Lazarovich-Hrebelianovich dochodzą do wniosku, że karmienie zwierząt nawet bardzo dużymi ilościami drobnoustrojów wolnych od bakteriofagów, nie prowadzi do powstawania tych ostatnich w jelitach. Doświadczenia przeprowadzili na szczurach, kurach oraz świnkach morskich, w stosunku do drobnoustrojów grupy czerwonek i pał. okrężnicy. Karmili świnki morskie szczepami czerwonkowymi zawierającymi bakteriofagi oraz wolnymi od bakteriofagów. Gdy w czasie doświadczenia stwierdzano w kale świnki bakteriofagi, to w tych wypadkach zawsze je można było wykazać w wyjściowej hodowli drobnoustrojowej użytej do karmienia.

Gildemeister i Ahlfeld ostatnio badali kał 12 kur na zawartość bakteriofaga dla duru, durów rzekomych, czerwonek oraz pał. okrężnicy. Znaleźli oni w kale wszystkich badanych zwierząt bakteriofagi dla pałeczek czerwonk. (najczęściej równocześnie dla Shiga, Flexnera i Y.). Kał 4 zwierząt zawierał bakteriofagi durowe, z nich w 3 przypadkach również dla duru rzekomego B. W kale 8 zwierząt znajdowały się bakteriofagi dla pał. okrężnicy. Z prób kału wszystkich 12 zwierząt wyhodowali szczepy pał. okrężnicy. Okazało się, że 11 spośród tych szczepów było nośicielami bakteriofagów odpo-

wiadających bakteriofagom otrzymanym z kału. Oprócz tego, wykonano doświadczenie z kałem ludzi. Badaniu poddano próby kału zawierające bakteriofagi, a pochodzące od 10 osób. W kale wszystkich 10 osób znajdowały się bakteriofagi dla różnych grup czerwionki, oprócz tego 2 zawierały bakteriofagi durowe, 3 — dla pał. okrężnicy. Ze wszystkich tych 10 prób wyhodowano szczepy pał. okrężnicy z których 8 było nosicielami bakteriofagów. Pomiedzy tymi ostatnimi bakteriofagami a otrzymanymi w przesączach odpowiednich prób kału istniała daleko idąca analogia działania, t. zn. działały one na te same szczepy.

Wyniki wszystkich tych prac dowodzą niezbicie, że obecność bakteriofagów w przewodzie pokarmowym łączy się przede wszystkim z obecnością w nim drobnoustrojów-nosicieli.

Przenikanie bakteriofagów jelitowych do świata otaczającego.

W związku z badaniem rozpowszechnienia bakteriofaga, stwierdzono częstą jego obecność w rozmaitego rodzaju wodach ściekowych, wodach powierzchniowych rzek, jezior, stawów i w wodzie morskiej. Okazało się przy tej sposobności, że zawartość bakteriofaga dla drobnoustrojów grup jelitowych w próbie świadczy zawsze o tym, że do wody dostają się zanieczyszczenia kałowe.

Dumas pierwszy badał wodę na zawartość bakteriofagów. Znalazł on w wodzie Sekwany oraz w wodzie kanałowej w Paryżu bakteriofagi dla pał. okrężnicy i pał. typu Shiga.

D'Herelle wykazywał bakteriofagi w wodzie portów morskich. Nie znalazł ich w wodzie pobranej na otwartym morzu.

Zdąnsky dochodzi do wniosku że bakteriofagi znajdujące się w wodach zanieczyszczonych kałem działają na wszystkie niemal szczepy pał. okrężnicy jakie dają się z tych wód wyhodować.

Arnold wykazał w wodach powierzchniowych bakteriofagi dla pał. okrężnicy, pał. durowej oraz czerwonek.

Gildemeister i Watanabe, badając wodę Sprewy w jej biegu górnym oraz w przepływie przez Berlin, wodę kanałów berlińskich, różne wody ściekowe i wody licznych jezior stwierdzili, że zawartość bakteriofagów w nich zależy od pogody. Znajdowali oni w wodach powierzchniowych bakteriofagi durowe, rzekomo durowe, czerwonek oraz dla pał. okrężnicy. Tylko wody jezior znajdujących się w otoczeniu higienicznie korzystnym były ubogie w bakteriofagi. W tych wodach, w których stwierdzano

dużą zawartość bakteriofagów znajdowały się też zwykle bakteriofagi dla duru, durów rzekomych i pał. okrężnicy, wszędzie zaś gdzie w ogóle stwierdzano bakteriofagi — działały one przede wszystkim na pał. czerwonek. Działo się to do tego stopnia, że w wodach ubogich w bakteriofagi były one skierowane wyłącznie na pałeczki czerwonek. Autorzy nie znaleźli w żadnej z badanych prób wody bakteriofaga dla przecin owoć w cholery, co zgadza się z założeniami D'Herelle'a, który przyjmuje, że jeżeli na jakimś terenie od pewnego dłuższego czasu nie pojawia się cholera, to w wodach brak bakteriofaga dla jej przecinkowca.

Goldberżanka i Sierakowski znajdowali bakteriofagi dla duru, durów rzekomych, czerwonek i pał. okrężnicy w wodach warszawskich W ściekach. prawie zawsze wykazywali oni bakteriofagi dla wszystkich wymienionych grup, zawierały je, aczkolwiek nie zawsze, woda z Wisły, w okolicy Siekierok oraz woda z osadników na filtrach. W wodzie wodociągowej były obecne 3-krotnie bakteriofagi, przeważnie czerwonekowe.

Schlossman przeprowadził podobne badania w Estonii. Według jego danych, w wypadkach pierwotnych zanieczyszczeń kałowych wody, były obecne przede wszystkim bakteriofagi dla czerwonek. Bakteriofagi durowe, rzemodurowe i dla pał. okrężnicy świadczą o zanieczyszczeniu wyższego stopnia. Autor ten znajdował w badanych wodach bakteriofagi dla duru, duru rzekomego B, Shiga, Flesnera, cholery oraz pał. okrężnicy.

Imbasciati badał zawartość bakteriofagów w niektórych rzekach wpadających do morza Tyrreńskiego. Znajdował bakteriofagi dla całej grupy czerwonek, jeden raz dla durów rzekomych A i B i pał. okrężnicy, natomiast w żadnej z prób nie znalazł bakteriofagów dla duru ani dla duru rzekomego C. Uwzględniając warunki higieniczne badanych wód, autor dochodzi do wniosków podobnych jak w pracach poprzednich badaczy.

Jak wynika z przytoczonych prac, najbardziej rozpowszechnionym spośród bakteriofagów dla grup czerwonek, duru, durów rzekomych i pał. okrężnicy jest bakteriofag czerwony. Bakteriofagi dla duru i durów rzekomych są stosunkowo rzadkie. Widzimy, że badania nad bakteriofagami mogą stanowić duże osiągnięcie dla metodyki badań higieniczno-epidemiologicznych. Dzięki nim, obok metod używanych dotychczas dla określania stopnia pierwotnego kałowego zanieczyszczenia wód oraz ich zanieczyszczenia kałowego w ogólności, obecnie znajdzie niewątpliwie zastosowanie oznaczanie obecności bakteriofagów grup jelitowych. Metody te mogą być tym korzystniejsze, że rozbiór jakościowy znajdujących w wodzie bakteriofagów daje nam możliwość poznania nie tylko stopnia higieny, ale również uzupełnia obraz epidemiologiczny terenu, bowiem zdaje się nie ulegać wątpliwości, że bakteriofag jest

towarzyszem odpowiedniego drobnoustroju. Oczywiście, współżycie to należałoby pojmować szeroko, gdzie pojęciem „drobnoustrój” obejmuje się wszystkie szczepy danego gatunku związane z pewnym terenem, wraz z całą ich biologią. Takiemu właśnie środowisku drobnoustrojów towarzyszy zjawisko odpowiedniego bakteriofaga. Jest bowiem dla nas na tym miejscu obojętnym czy jest to czynnik swoisty czy też ujawniający się w odpowiednim środowisku wskutek posiadanej potencjalnej wieloważności.

II.

Bakteriofagi durowe w otoczeniu przypadków duru brzuszego.

Praca niniejsza miała na celu poznanie zachowania się bakteriofaga durowego w otoczeniu chorych na dur brzuszny. Problem ten jest ciekawy dlatego, że środowiska te są obfitym źródłem nosicieli pałeczki durowej.

W Pracowni Bakteriologicznej Miejskiego Instytutu Higieny w Warszawie badano w kierunku nosicielstwa kał osób z otoczenia przypadków duru jakie rejestrowano na terenie miasta. Korzystając z tej okazji, przeprowadzono w pewnej części materiału badania nad zawartością bakteriofagów durowych w kale.

Obrano następującą metodykę: Niewielką ilość kału umieszczano w probówkach zawierających około 15 cm bulionu zwykłego, po czym wstawiano do ciepłarki na 24 godz. Następnie każdą hodowlę sączono przez świecę Chamberlanda L. 3. Przesącze przechowywano w lodówce. Świeże, 24-godzinne hodowle pał. durowych rozmazywano na płytkach agarowych, następnie na tak zasiane płytki wlewano po 2 krople przesącza. Płytki dzielono na 6 sektorów tak, że na każdej znalazło się 6 przesąców. Krople spadały w ten sposób, że od środka płytki sływały ku obwodowi, jednakże na skutek uprzedniego mocnego podsuszenia płytek nie rozplywały się na boki, lecz wsiąkając pozostawiały ostro odgraniczony ślad o zarysach dużego wykrzyknika lub odcisku stopy ludzkiej. Płytki umieszczono w ciepłarce na przeciąg 1 doby, po czym następowało odczytanie.

W wypadkach gdy przesącz zawierał bakteriofaga rozpuszczającego dany szczep durowy, obserwowano w obrębie jego śladu zupełny, częściowy lub do pojedynczych łysinek ograniczony brak wzrostu. Jako detektorów użyto 30 różnego pochodzenia i wieku szczepów pał. durowej. Szczepy te wielokrotnie badane na zawartość bakteriofagów zachowywały się w ciągu całego czasu trwania doświadczeń dość stale, przy czym 4 z nich były nosicielami bakteriofagów durowych. Żaden z tych 4 szczepów nie zawierał bakteriofaga

działającego na własne pał. durowe. Przy każdym doświadczeniu nastawiano kontrole ze znanymi już przesączami zawierającymi bakteriofagi.

Doświadczenia wykonano w 2 okresach:

1. W czasie od 23. 3. do 16. 10 1942 r., kiedy zbadano kał 161 osób.

2. W czasie od 20. 3. do 3. 10. 1943 r., kiedy zbadano kał 179 osób.

Były to wszystko osoby z otoczenia chorych lub podejrzanych o dur brzuszny.

Równolegle, każdy kał był wysiewany i badany w kierunku pał. durowych. Wysiewano bezpośrednio na podłoża Endo i Müller-Kaufmanna, z tego zaś ostatniego ponownie na Endo. Do podłoża Endo dodawano 5% żółci.

Dodatknie wyniki, zarówno co do obecności bakteriofagów jak i pał. durowych, zebrane są w tabelkach Nr 1 i Nr 2.

Rozważając powyższe wyniki i ujmując je w cyfrach, otrzymamy następujący obraz: w 1-szym okresie doświadczeń stwierdzono na 161 zbadanych prób kału 19 razy obecność bakteriofaga durowego, co stanowi 11,8%. Pał. durowe wyhodowano w 4 przypadkach (2,5%).

W 2-gim okresie, na zbadanych 179 prób wykryto bakteriofaga durowego w 5 przypadkach co stanowi 2,8%, zaś pałeczki durowe w 1 przypadku (0,6%).

Różnica częstości wystąpienia bakteriofagów w obu tych okresach jest dość znaczna. Wprawdzie w obu okresach badano kał otoczenia osób chorych jednakże warunki epidemiologiczne terenu były odmienne. Jak wiadomo bowiem, w roku 1942 było w Warszawie dość dużo zachorowań na dur brzuszny, zaś w r. 1943 zaledwie pojedyncze przypadki. W czasie zagęszczania się przypadków choroby takiej, jaką jest dur brzuszny, wzrasta też niewątpliwie zakażenie całego terenu pałeczką durową. Poza tym, gdy zachorowań jest mało, podobnie jak to obserwowano w r. 1943 w Warszawie, wtedy bywa więcej zgłaszanych przypadków podejrzanych. Oczywiście, otoczenie tych przypadków nie ma najczęściej żadnego kontaktu z pał. durową. Te uwagi rzucają wyraźne światło na wspomnianą różnicę w wynikach. W ten sam sposób świadczy też duża równoległość pomiędzy częstością dodatnich posiewów na dur a występowaniem bakteriofaga durowego (tab. 1 i 2).

Tablica 1.

Nr badania	Posiew katu na d. b.	Działanie przesączów													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
7251	+	+++	+++	+++	++	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	++	+
9319	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10719	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
10731	-	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++	-
14043	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14055	-	+	+	++	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
14059	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
14301	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
14329	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
15751	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
15759	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17625	-	++	+	++	++	+	++	+	+++	+	+++	+	-	++	-
18131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18677	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
18707	-	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	-	++	-
19561	-	+	+	+	-	+++	-	-	-	-	+	+	+	-	++
19587	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
19591	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
19983	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
20262	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
21925	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++	+	+	-	-
20354	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablica 2.

3999	+	++	++	+	+	+	++	+	+++	++	+++	++	-	++	-
13479	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	+++	-	+	-
16111	-	+++	+	+	+	+++	+	+	++	+	+	++	++	-	-
16398	-	+	+	+	+	+	+	+	++	-	++	-	-	+	-
16660	-	++	++	++	+	++	+	+	++	+	+	++	-	+	-

Sposób oznaczania wyników:

1. Brak wzrostu na 50 — 100% powierzchni śladu +++
2. „ „ w postaci zlewających się łysinek, do 50% pow. śl. ++
3. „ „ „ „ pojedynczych łysinek
4. Normalny wzrost na całej powierzchni śladu

(Wyniki z roku 1942).

na szczepy durowe

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
+	+++	+++	+++	+	++	-	+	-	-	++	++	+	-	+	-
-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
++	++	-	-	-	+	-	-	-	++	-	+	-	-	-	+
-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+++
-	++	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	+
+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+

(Wyniki z roku 1943)

+	++	-	++	-	++	++	-	++	++	++	+	-	-	++	++
++	++	-	-	-	+	-	+++	-	+++	++	+++	-	+	++	-
-	++	++	++	+	++	-	-	-	+	+	++	++	-	-	+
+	+	-	-	-	+	+	-	-	++	+	+	++	-	-	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++	-	-	+	+

Jeżeli chodzi o zakres działania przesączów, to wśród wszystkich 24 dodatnich nie było ani jednego, któryby działał na wszystkie szczepy użyte w doświadczeniu. Jeden przesącz działał na 29 szczepów, jeden tylko na 3 szczepy. W ogólności, zachowanie to zobrazuje tabelka Nr 3.

Tablica 3.

Liczba przesączów	Z 30 szczepów ulegało działaniu
8	3 — 10
9	11 — 20
7	21 — 29

Widzimy zatem, że zakresy działania poszczególnych przesączów są bardzo różne. Należy bowiem uwzględnić, że działają one nie tylko na mniejsze lub większe liczby szczepów, ale działają też na różne szczepy.

Z tablic Nr 1 i Nr 2 wynika, że nie natrafiono wśród wszystkich użytych 30 szczepów durowych ani na jeden, któryby był wrażliwy na wszystkie dodatnie przesącze. Jeden z tych szczepów wrażliwy był na 21, dwa szczepy tylko na 5, największa ilość bo 9 szczepów na 14 przesączów. Widać zatem, że chcąc w podobnych doświadczeniach uchwycić maksymalną ilość dodatnich wyników, należy wprowadzać możliwie dużą liczbę szczepów.

Siła działania przesączów idzie równolegle do ich rozpiętości działania. Przesącze rozpuszczające małą ilość szczepów działały zawsze słabo. (+)

Bakteriofag durowy w poszczególnych środowiskach.

Jeżeli chodzi o liczebność poszczególnych przebadanych środowisk, to były one różne, od pojedynczych osób do grup złożonych z 7 osób. Ich stan liczebny przedstawia tabl. Nr 4.

A zatem, oprócz pojedynczych osób, zbadano 92 środowiska złożone z różnej ilości osób, w granicach od 2 do 7.

Bakteriofagi wykryto: u 5 pojedynczych osób, w 3 środowiskach 2-osobowych, 4 środowiskach 4-osobowych i 2 środowiskach 5-osobowych. W obrębie poszczególnych środowisk tylko 2 z nich zawierały po 2 osoby, w kale których stwierdzono bakteriofagi. Były to Nr Nr 14059 i 14301 oraz 19587 i

19591. Obie te dodatnie pary przesączów wystąpiły w środowiskach 3-osobowych. Wszystkie inne dodatnie przesącze wystąpiły pojedynczo. Przesącze Nr Nr 14059 i 14301 nie były

Tablica 4

Liczebność środowisk	Liczba zbadanych środowisk lub osób
z 2 osób	30
z 3 „	30
z 4 „	14
z 5 „	10
z 6 „	7
z 7 „	1
pojedynczych osób	35

w działaniu do siebie podobne, przesącze Nr Nr 19587 i 19591 wykazują niejake podobieństwo, co widać z tablicy 1.

Wszystkie dodatnie wyniki posiewu kału na obecność pał. durowych pochodzą z różnych środowisk. Dwukrotnie otrzymano przy dodatnim posiewie kału również bakteriofagi durowe. Z rozmieszczenia bakteriofaga w poszczególnych środowiskach widać, że nie przenika on ich jak jakiś czynnik łatwo udzielający się, lecz ogranicza się zwykle do pojedynczych osób.

Stosunek bakteriofaga do nosicielstwa durowego.

Pewną liczbę spośród zbadanych przypadków, zwłaszcza nosicieli, poddano o ile możliwości bliższej obserwacji, której wyniki jakkolwiek dość szczupłe, rzucają jednak pewne światło na zagadnienie.

1. Nosicielka G.

Wykryta na początku doświadczeń, została przebadana najdokładniej ze wszystkich innych. Z kału tej osoby wydowano wielokrotnie pał. durowe w ciągu 2 lat, w tym też okresie kał jej zawierał stale bakteriofaga o stałym typie

działania. Badania te były wykonane w odstępach kilkumiesięcznych. Wyniki ich zebrane są w następującym zestawieniu:

Nr badania kału	Wynik posiewu na pałeczki durowe	Bakteriofag
7251	+	+
19553	—	+
26020	+	+
50379	+	+
44645	—	+

Wyhodowane szczepy durowe Nr Nr 7251, 26020 i 50379 zbadano na zawartość bakteriofagów durowych. Bulionowe 24-godzinne hodowle ich poddawano sączeniu i postępowano dalej według opisanej na początku metody. Okazało się, że z wyjątkiem szczepu 7251, oba pozostałe zawierały w hodowlach bakteriofagi działające na jednakowe szczepy i z jednakową siłą. Bakteriofagi te nie działały na oba noszące je szczepy pał. durowej, działały natomiast na pierwszy t. j. 7251. Równocześnie, przesącze wszystkich badanych prób tej osoby zawierały bakteriofagi o identycznym działaniu jak te otrzymane ze szczepów durowych, a więc miały identyczny zakres i siłę działania, nie rozpuszczały szczepów 26020 i 50379, rozpuszczały zaś szczep 7251.

Na podstawie tych wyników należy przyjąć, że nosicielka G. wydalala w kale bakteriofagi durowe związane ściśle z pał. durową. To, że szczep 7251 nie zawierał w hodowlach bakteriofaga i był wrażliwy na działanie bakteriofaga zawartego w kale możnaby tłumaczyć jego pochodzeniem z kolonii „nie noszącej”. Jest to tym prawdopodobniejsze, że jak zaznaczono powyżej, posiewy wykonywano na podłożu Endo z dodatkiem 5% żółci, która hamuje bakteriofagi.

2. Nosicielka R.

Nr badania kału	Wynik posiewu na d. b.	Bakteriofag
20354	+	—
36555	+	—
16111	—	+

Wyhodowane szczepy durowe nie zawierały w hodowlach bakteriofagów. Natomiast z próby kału 16111 otrzymano szczep pał. okrężnicy, którego hodowle zawierały bakteriofaga o tym samym typie działania jaki miał bakteriofag otrzymany z tej samej próby kału. W tym wypadku jak widać, za wystąpienie bakteriofaga w kale odpowiedzialna jest pał. okrężnicy.

3. Nosicielka K.

Nr badania kału	Wynik posiewu na d. b.	Bakteriofag
1123	+	+
16594	—	+
37545	+	nie badano

Oba dodatnie przesącze działały jednakowo, przyczym działały też na szczepy pał. durowej otrzymane z kału tej osoby. Szczepy durowe nie zawierały bakteriofaga.

4. Nosicielka B.

Nr badania kału	Wynik posiewu na d. b.	Bakteriofag
14043	+	—
21935	—	+
44553	+	—
3114	+	—

Wyhodowane szczepy pał. durowej nie zawierały w swoich hodowlach bakteriofagów, nie natrafiono też na żadne inne drobnoustroje, któreby były nosicielami tego czynnika. W każdym razie należy tu podkreślić, że obecność bakteriofaga wystąpiła wtedy kiedy posiew kału dał wynik ujemny.

5. Nosicielka S.

Nr badania kału	Wynik posiewu na d. b.	Bakteriofag
44391	+	—
45871	+	—
1316	+	—

W tym przypadku otrzymywano stale dodatnie wyniki posiewu przy braku bakteriofaga. Przypadek ten, jak również i poprzedni nasuwają przypuszczenie, że niekiedy pomiędzy obecnością w kale bakteriofaga durowego i pał. durowej zachodzi stosunek naprzemienny. Oczywiście byłoby to możliwe wtedy, gdyby bakteriofag nie był związany ze szczepem pał. durowej, przy istniejącej równocześnie wrażliwości szczepu durowego na działanie lityczne.

6. Przypadek z otoczenia K.

Kał tej osoby badany poraz pierwszy (Nr 19561) zawierał bakteriofaga durowego, natomiast jego posiew na dur był ujemny. Osoba ta po 3 tygodniach zachorowała na dur brzuszny. W pierwszym tygodniu choroby wyhodowano z jej kału pał. durową (Nr 20178), a przesącz tego kału zawierał bakteriofaga o podobnym typie działania jak poprzedni. Szczep pał. durowej nie był niestety badany na zawartość bakteriofaga.

7. Przypadek po chorobie S.

Nr badania kału	Wynik posiewu na d. b.	Bakteriofag
3999	+	+
13902	—	—
16616	—	—

W tym przypadku, wraz z wygaśnięciem (przynajmniej czasowym) nosicielstwa nie pojawił się też w kale bakteriofag.

Z przytoczonych przykładów wynika, że u osób, u których wyhodowano pał. durowe, zjawiał się często bakteriofag durowy. Bakteriofag ten występował bądź stale, bądź też obecność jego ulegała wahaniom, przyczym pojawiał się dość nieregularnie w stosunku do dodatniego posiewu kału na d. b. Zwykle jednak wynik badania był dodatni w jednym lub drugim kierunku tak, że mogło to sprawiać wrażenie zjawisk nawzajem się wykluczających. Ponadto, z protokołów wynika, że jeżeli bakteriofag pojawiał się u osób u których czy to równocześnie czy wogóle w ciągu całego okresu trwania doświadczeń wyhodowano pał. durowe, to był to bakteriofag działający na dużą liczbę szczepów pał. durowej i to

działający bardzo mocno (+++ i ++++). Dzięki temu stwierdzeniu mamy prawo przypuszczać, że do ujawnienia bakteriofagów w podobnych przypadkach wystarczy znacznie mniejsza uczba szczepów a niżeli w naszych doświadczeniach. Oczywiście, należałoby wtedy zwracać uwagę na siłę działania przesączów.

Jak wiadomo, wykrywanie nosicielstwa durowego u ludzi daje dotychczas wyniki bardzo niedokładne, dzięki czemu wielu nosicieli unika kontroli.

Zastosowanie badania kału na obecność bakteriofagów durowych mogłoby doskonale uzupełnić wyniki otrzymane z posiewów. Metodykę można bardzo wydatnie uprościć, zastępując sączenie jednogodzinnym ogrzewaniem w temp. 58—60 stopni C. Postępowanie takie zabija jak wiadomo całą niezarodnikującą mikroflorę jelitową, nie uszkadza zaś bakteriofagów. Do wykrywania bakteriofagów możnaby używać niewielką liczbę szczepów pał. durowej, które jednakże poprzednio musiałyby być wybrane jako najwrażliwsze.

Równocześnie z posiewem kału na podłoża wybiórcze i wzbogacające następowałby posiew na bulion zwykły. Po 1 dobie trzymania w termostacie, ogrzanie i wylewanie po 2 krople na sektory płytek zasianych szczepami durowymi. Po następnej dobie, odczytanie wyników.

Osoby, których kał zawiera mocnego bakteriofaga durowego, należy poddać odpowiedniej obserwacji z kilkakrotnym badaniem kału.

Wnioski.

1. W okresie nasilenia zachorowań na dur brzuszny, zbadano na nosicielstwo i obecność bakteriofaga durowego kał 161 osób z otoczenia przypadków choroby lub z otoczenia osób podejrzanych o dur brzuszny. Podobne badania kału 179 osób przeprowadzono na tym samym terenie po upływie roku, gdy przypadków zachorowań na d. b. było bardzo mało.

W pierwszym roku, na 161 przypadków, otrzymano bakteriofaga durowego 19 razy (11,8%), 4 razy zaś wyhodowano pał. durowe (2,5%).

W drugim roku, na 179 przypadków, otrzymano bakteriofaga durowego 5 razy (2,8%), pał. durowe 1 raz (0,6%).

Różnice te przemawiają za tym, że częstość występowania bakteriofaga w kale wzrasta w miarę wzrostu durowego zakażenia terenu.

2. Do wykrywania bakteriofagów w kale użyto 30 szczepów pał. durowej. Zdarzały się przesącze działające zaledwie na 3 ze wszystkich tych szczepów. Do uchwycenia maksymalnej liczby bakteriofagów w kale należy przeto używać dużej liczby szczepów pał. durowej.
3. Siła działania bakteriofagów durowych w przesączach kałów wzrasta równolegle ze wzrostem rozpiętości działania; przesącze rozpuszczające małą liczbę szczepów, działały równocześnie słabo, (pojedyncze łyśinki).
4. Wśród wszystkich zbadanych przypadków wyodrębniono 92 grupy-środowiska złożone z 2—7 osób. W 2 grupach 3-osobowych otrzymano po 2 przesącze zawierające bakteriofaga durowego. We wszystkich innych grupach, jeżeli ten bakteriofag wystąpił to tylko u pojedynczych osób. Świadczyłoby to o tym, że obecność bakteriofaga w jelitach nie jest wynikiem łatwego „zakażenia” się nim.
5. Powodem wystąpienia bakteriofaga durowego w kale mogą być noszące go pał. durowe lub pał. okrężnicy bytujące w danym przewodzie pokarmowym.
6. U osób, z których kału wyhodowano pał. durowe zjawiał się też bardzo często bakteriofag durowy. Jeżeli bakteriofag ten w tych właśnie wypadkach wystąpił, to działał na dużą liczbę szczepów i z dużą siłą.
7. Zaproponowano uzupełniającą metodę dla wykrywania nosicielstwa durowego.

S U M M A R Y.

1. Examination of faeces from persons in environment of typhoid fever patients has been made to discover Bact. typhosum and typhoid bacteriophage. The same kind of examination was repeated during typhoid fever epidemic, and then one year later. Among 161 persons examined during the first year, 19 were phage — positive and 4 were carriers of Bact. typhosum. From 179 persons examined during the second year, 5 were phage — positive and only 1 was found to be excreting the Bact. typhosum.
2. 30 strains of Bact. typhosum were used for bacteriophage detection. Some filtrates of faeces had act upon very few strains used (3).

3. Filtrates which acted with higher number of strains had a stronger lytic potency.
4. It was possible to differentiate 92 groups (families, persons living in the same house etc.) between all examined persons. Bacteriophage was found in faeces of single persons within this groups — with the exception of two groups (3 persons ones).
5. The appearance of typhoid bacteriophage in faeces is connected sometimes with *Bact. typhosum* or *Bact. coli* as phage carriers.
6. Faeces of typhoid carriers contained often a typhoid bacteriophage. This bacteriophage acted upon very many strains and his action was very strong.
7. Proposition was made to apply a new method for typhoid carriers discovering.

P I Ś M I E N N I C T W O

- Arnold: Amer. J. Publ. Health 15, (1925), 950.
Beckwith, Rose: Journ. Bact. 20, (1930), 151.
Cadwell: Journ. Inf. Dis. 40, (1927), 575.
Dumas: C. r. Soc. Biol. Paris. 83, (1920), 1314.
Fukuda: Ztschr. f. Immunitf. 54, (1928), 369.
Gidemeister, Ahlfeld: Zbl. f. Bakt. Orig. 117, (1941), 417.
Gildemeister, Herzberg: Zbl. f. Bakt. Orig. 93, (1924), 402.
Gildemeister, Watanabe: Zbl. f. Bakt. Orig. 122, (1931), 556.
Goldberżanka, Sierakowski: Med. Dośw. Społ. 14, (1932), 837.
Hadley: Journ. Inf. Dis. 34, (1924), 260, streszcz. Zbl. Ges. Hyg. 8, (1924), 449.
Hadley: Journ. Inf. Dis. 37, (1925), 35, streszcz. Zbl. Ges. Hyg. 11, (1926), 701.
Hadley, Jimenez: Journ. Inf. Dis. 48, (1931), 176, streszcz. Zbl. Ges. Hyg. 25, (1931), 48.
D'Herelle: Le bacteriophage et ses applications therapeutiques, Paris, 1933.
Hoder: Bakteriophagen. Handb. d. Viruskrankheiten, Jena, 1939.
Hoder, Akano: Ztschr. f. Immunitf. 85, (1935), 423.
Hoder, Hrebelianovich: Ztschr. f. Immunitf. 76, (1932), 141.
Hoder, Lazarovich-Hrebelianovich: Ztschr. f. Hyg. 115, (1933), 553.
Hoder, Toyoda: Ztschr. f. Immunitf. 70, (1931), 271.
Imbasciati: Igiene Mod. 5, (1940), 18, streszcz. Zbl. Ges. Hyg. 47, (1941), 472.

- Klieneberger: Zbl. f. Bakt. Orig. 123, (1932), 318.
- Ławrynowicz, Piotrowska, Stankowska: P. Gaz. Lek. 50 (1928), 917.
- Nyberg: Zbl. f. Bakt. Orig. 122, (1931), 270.
- Ohashi. J.: Shang. Sci. Inst. Sect. IV, 5, (1939), 1, streszcz. Zbl. Ges. Hyg. 46, (1940), 366.
- Ohashi: Shang. Sci. Inst. Sect. IV, 5, (1940), 35, streszcz. Zbl. Ges. Hyg. 47, (1941), 230.
- Ohashi: Shang. Sci. Inst. Sect. IV, 5. (1940), 47. streszcz. Zbl. Ges. Hyg. 47, (1941), 230.
- Ohashi: Zbl. f. Bakt. Orig. 146, (1940), 185.
- Otto, Munter: Bakteriophagie. Handb. d. pathogenen Mikroorganismen, I, 1, III Aufl.
- Schlossmann: Ztschr. f. Hyg. 114, (1932), 65.
- Yen: Chin. Med. Journ. 57, (1940), 330, streszcz. Zbl. Ges. Hyg. 47, (1941), 139.
- Zdansky: Ztschr. f. Hyg. 103, (1924), 164.
-

Z Zakładu Bakteriologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik: Prof. dr St. Legeżyński
i Państwowego Zakładu Higieny — Zakład Produkcji w Krakowie
Kierownik: Dr med. Z. Przybylkiewicz

Z BADAŃ
NAD BIOLOGIĄ PAŁECZEK CZERWONKOWYCH.
POKREWIEŃSTWO ANTYPGENOWE PAŁECZEK
OKRĘŻNICY (BACT. COLI) Z PAŁECZKAMI DUROWO-
PARADUROWYMI I CZERWONKOWYMI. *)

KURYŁOWICZ W., ŚLOPEK ST.

Pierwsze spostrzeżenia nad aglutynacją pałeczek okrężnicy w surowicach czerwonych poczynili Duval i Schorer (1904). Obok typowych szczepów czerwonych wyosobnili szczepy pałeczki okrężnicy aglutynujące się w wysokich rozcieńczeniach surowic czerwonych.

Nieco później Kuhn i Woithe (1909) stwierdzili nadto, że surowica uzyskana drogą uodparniania zwierząt szczepami pałeczek okrężnicy, aglutynującymi w surowicach czerwonych, zlepia również pałeczki czerwone. Zjawisko zlepienia się bakterii w surowicach heterologicznych określili jako paraglutynację.

Zjawisko paraglutynacji wzbudziło duże zainteresowanie w świecie mikrobiologów; dowodem tego są liczne publikacje ukazujące się aż do ostatnich czasów. Wśród prac dotyczących paraglutynacji pałeczek okrężnicy w surowicach czerwonych wymienić należy Kuhna, Gildemeister i Woithe (1911, 1912) Ebelinga (1913) Bussona (1914) Kuhna i Ebeling (1915), Baerthleina (1915), Manteufela (1915), Flatzeka (1916), Ornsteina (1918), Almagia (1919) Breinla (1921) Egyedi i Kulka (1925), Silbersteina (1930), Amalfitano (1935), Hayashi (1938), Mackie (1939), Mackie i Schweiger (1939), Simizu (1939), oraz mniej liczne jeśli chodzi o paraglutynację w surowicach duroparadurowych (Kuhn i Woithe (1909), Kuhn (1916), Breinl (1921) i Engering (1924).

*) Pracę wykonano w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej U. J. K. we Lwowie. Przygotowano do druku w jesieni 1943 r.

Badania, dotyczące mechanizmu odczynu paraglutynacyjnego wskazują na jego niejednorodny charakter. Uwidacznia się to w zachowaniu się paraglutynujących szczepów. U jednych zjawisko to jest przemijające — czasowe, u innych bardziej trwale utrzymujące się miesiącami, a nawet latami. To różnorodne zachowanie się starano się uzasadnić teoretycznie i udowodnić doświadczalnie. Przejściową paraglutynację tłumaczono absorpcją aglutynogenu względnie precypitynogenu, ze środowiska w którym się swoisty zarazek znajduje, na powierzchni pałeczek okrężnicy. Za tą możliwością przemawiają badania, wskazujące, że niektóre szczepy pałeczek okrężnicy zachowują zdolność zlepiania się w surowicach heterologicznych tak długo jak długo przeżywają w środowisku naturalnym; pasażowane na podłożach sztucznych cechy te tracą (Bussion 1911, Kuhn 1916, Breinl 1921). Keysser Kuhn i Ebeling (1915) oraz Otto i Sukiennikowa (1923) uzyskali paraglutynujące szczepy pałeczek okrężnicy hodując je bądź to razem ze szczepami czerwinkowymi, bądź na agarze przygotowanym na bulionie, na którym rosły uprzednio pałeczki czerwinkowe, wreszcie w hodowlach tychże drobnoustrojów rozpuszczonych pod wpływem swoistego bakteriofaga. Kuhn, Gildemeister i Woithe (1911) starali się uzyskać podobne szczepy wstrzykując pałeczki okrężnicy królikowi uodpornionemu pałeczkami Flexnera. Stwierdzili jednakże bardzo słabą aglutynację w wysokowartościowej surowicy czerwinkowej typu Flexner.

Lentz (1931) na podstawie prac Keyssera zajmuje stanowisko pośrednie, przyjmując, że pałeczki okrężnicy znajdując się w środowisku, gdzie obecne są również pałeczki czerwinkowe, co ma miejsce przede wszystkim w kale chorych na czerwonkę pochłaniają antygeny czerwinkowe i tak przestrajają swą przemianę inaterii że ich potomne komórki zaczynają wytwarzać antygeny czerwinkowe, zachowując tę cechę przez wiele generacji.

Na trwalszy charakter cech paraglutynacyjnych wskazują badania Kuhna (1916), Flatzeka (1916) i Engeringa (1924). Utrzymywanie się cech paraglutynacyjnych miesiącami a nawet latami, nasunęło przypuszczenie, że tkwić one muszą głębiej w komórce i samym procesem absorpcji na powierzchni komórki wyjaśnić się nie dadzą. Tłumaczenie zjawiska paraglutynacji przestrojeniem struktury antygenowej pod wpływem odpornościowych sił ustroju ludzkiego czy zwierzęcego nie zyskało potwierdzenia w doświadczeniu (Kuhn, Gildemeister i Woithe (1911). Dopiero nowsze badania nad budową antygenową i pokrewieństwem antygenowym drobnoustrojów rzuciły nieco światła na to zagadnienie. Silberstein (1930) na podstawie dokładnej analizy wyników aglutynacji i absorpcji aglutynin dochodzi do wniosku, że wśród paraglutynujących szczepów pałeczek okrężnicy spotyka się szczepy pod względem budowy antygenowej bardzo zbliżone do pałeczek czerwinkowych. Surowice uzyskane drogą uodparniania zwierząt tymi szczepami zawierają 2 rodzaje niweczników — przeciwczerwinkowe i przeciwookrężnicze; po wysyceniu takiej surowicy pałeczkami okrężnicy

antygenowo zbliżonymi do szczepów paraglutynujących, a nie wykazujących powinowactwa ze szczepami czerwinkowymi pozostają w surowicy przeciwciała czerwinkowe i naodwrot wysycając pałeczkami czerwinkowymi pozostawiamy niełknięte przeciwciała dla pałeczek okrężnicy. Wyniki te wskazujące na antygenowy związek pałeczek okrężnicy z pałeczkami czerwinkowymi potwierdzili następnie Hayashi (1938) i Mackie (1939).

Badania Kuryłowicza, Mikulaszka i Słopka (1939 w druku) nad mechanizmem odczynu Weil-Felixa, który jest typowym przykładem odczynu paraglutynacyjnego wykazały, że podśawa paraglutynacji szczepów odmienia X₁₉ w surowicach chorych na dur osutkowy tkwi we wspólnych frakcjach antygenowych pałeczek odmienia X₁₉ i zarazka duru osutkowego (Rickettsia prowazeki). Frakcje te chemicznie odpowiadają wielocukrom bakteryjnym.

Jeden i ten sam szczep pałeczki okrężnicy może wykazywać własności paraglutynacyjne w stosunku do różnych surowic równocześnie. Często obserwowano równoczesną paraglutynację w surowicy durowej, paradurowej A i C (Engering 1924) lub w surowicy durowej i surowicach czerwinkowych (Ornstein 1918).

Obecność szczepów paraglutynujących prowadzić może zdaniem niektórych autorów (Baerthlein 1915, Flatzek 1916, Kuhn 1916) do pomyłek diagnostycznych przy rozpoznawaniu pałeczek durowo-paradurowych i czerwinkowych. Większość jednakże badaczy biorąc pod uwagę, że szczepy paraglutynujące spotyka się w przeważającej liczbie u chorych na czerwonkę względnie schorzenia durowo-paradurowe lub u wydzielaczy i nosicieli tychże pałeczek, uważa, że paraglutynacja pałeczek okrężnicy jest dla tych schorzeń charakterystyczna i stanowi cenną pomoc w diagnostyce, zwłaszcza w przypadkach ujemnych wyników posiewów i stanowi pobudkę do dalszych badań celem wykazania swoistego zarazka (Kuhn 1916, Otto i Sukienikowa 1913, Engering 1924, Lentz i Prigge 1931, Silberstein 1930).

Występowanie paraglutynujących szczepów pałeczek okrężnicy w czerwonce i schorzeniach durowo-paradurowych nie jest jednakże regułą, spotkano je również u ludzi zdrowych, u zwierząt zdrowych, a także i poza organizmem ludzkim, czy zwierzęcym (Kuhn, Gildemeister i Woithe 1914, Busson 1911, Breinl 1921, Simizu 1939).

Badania własne.

Zachęcenii wynikami badań nad mechanizmem odczynu Weil-Felixa i korzystając z obfitego materiału diagnostycznego, postanowiliśmy zająć się bliżej zjawiskiem paraglutynacji szczepów pałeczek okrężnicy w surowicach durowo-paradurowych i czerwinkowych, oraz wyjaśnieniem powinowactwa antygenowego pomiędzy powyższymi grupami drobnoustrojów.

Do badań użyliśmy 10 paraglutynujących szczepów pałeczek okrężnicy (*Bact. coli* 51, m, 1125, k, 543, 958, 1950, d, 50 i 556) wyosobnionych w latach 1941—1942 z kału chorych na czerwonkę i zapalenia nieżytowe jelit nieczerwonkowe, za wyjątkiem szczepu nr 51, który wyosobniono z moczu chorego na czerwonkę.

Cechy morfologiczne i biochemiczne badanych szczepów zestawione są w tabeli nr 1.

Tabela 1.

<i>Bact. coli</i>	Gram	ruch	Voges Proskauer	żelatyna	indol	mleko	cukier groszowy	cukier mlekozowy	cukier słodowy	cukier trzciniowy	mannit	dulcyt
51	—	—	—	—	—	kw. kg.	++	++	++	—	++	—
m	—	—	—	—	+	kw. kg.	++	++	++	—	++	—
1125	—	—	—	—	+	kw. kg.	++	++	++	—	++	—
k	—	—	—	—	+	kw. kg.	++	++	++	—	++	—
543	—	—	—	—	—	kw.	++	++	++	—	++	—
958	—	+	—	—	+	kw. kg.	++	++	++	—	++	—
1950	—	+	—	—	+	kw. kg.	++	++	+++	—	++	—
d	—	—	—	—	+	kw. kg.	++	++	++	—	++	—
50	—	—	—	—	+	kw. kg.	++	++	++	—	++	—
556	—	—	—	—	+	kw. kg.	++	++	++	—	++	—

Uwaga: ++ oznacza fermentację kwaśną i gazową

kw. = zakwaszenie mleka

kw. kg = zakwaszenie i koagulacja mleka.

Jak widzimy, wszystkie badane szczepy odpowiadałyby pałeczkom oznaczanym w systematyce bakteryjnej jako pałeczki okrężnicy (*Bact. coli*).

Cechy powyższe utrzymywały się stale, o czym mieliśmy sposobność przekonać się w czasie badań kontrolnych, wykonanych sześciokrotnie w ciągu dwuletniej obserwacji.

Badania serologiczne przeprowadzaliśmy w dwu kierunkach. Badaliśmy zachowanie się szczepów pałeczek okrężnicy w wysokowartościowych surowicach czerwonkowych i durowo-paradurowych, oraz zachowanie się surowic otrzymanych

drogą uodparniania zwierząt (króliki) szczepami paraglutynujących pałeczek okrężnicy wobec pałeczek czerwonych i durowo-paradurowych.

1. Zachowanie się szczepów pałeczek okrężnicy w surowicach czerwonych i durowo-paradurowych.

Wyniki odczynu aglutynacyjnego (tabela 2) wskazują na powinowactwo antygenowe badanych szczepów pałeczek okrężnicy z pałeczkami czerwonymi i durowo-paradurowymi. Pokrewieństwo to szczególnie wyraźnie występuje jeśli chodzi o pałeczki duru brzuszego i paraduru C, oraz pałeczki czerwone Shiga-Kruse, Flexner i Castellani-Andrews.

Tabela 2.

Surowica	szczep. pałeczek okrężnicy									
	51	m	1125	k	563	958	1950	d	50	556
Paraduru A	—	—	—	100	—	—	—	—	—	—
B	—	—	—	100	—	—	—	—	200	—
C	400	200	800	1600	400	—	—	400	1600	1600
Duru brzuszego	—	—	—	800	—	—	—	—	400	400
Shiga-Kruse	800	800	—	—	—	—	—	—	—	—
Schmitz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Flexner poliv.	—	—	1600	800	400	—	—	400	200	200
Kruse-Sonne	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Castellani-Andrews poliv.	—	—	—	—	—	400	400	100	—	—

Uwaga: Liczby wskazują rozcieńczenie surowicy, w której odczyn wypada wyraźnie dodatnio.

Wyniki aglutynacji w surowicach monowalentnych Flexner i Castellani-Andrews, zebrane są w osobnych tabelach (tabela 3 i 4).

Celem stwierdzenia pokrewieństwa badanych pałeczek okrężnicy z poszczególnymi rasami grupy Flexner i dispar Castellani-Andrews wykonaliśmy odczyny aglutynacyjne z surowicami monowalentnymi obu tych typów (tabela 3).

Tabela 3.

Surowice monowalentne		Szczep. pałeczek okrężnicy									
		51	m	1125	k	543	958	1950	d	50	556
Flexner (rasa)	A	—	—	1600	400	—	—	—	800	200	200
	BC	—	—	200	3200	1600	—	—	400	1600	1600
	D ₁	—	—	400	400	—	—	—	200	400	400
	D ₂	—	—	200	100	100	—	—	100	100	200
	H ₁	—	—	3200	—	—	—	—	1600	200	200
	H ₂	—	—	1600	800	800	—	—	200	200	200
	F	—	—	400	—	—	—	—	200	200	200
	X ₁	—	—	800	—	—	—	—	800	200	400
	X ₂	—	—	400	200	—	—	—	100	200	200
	Y ₁	—	—	400	—	—	—	—	200	800	400
	Y ₂	—	—	400	800	400	—	—	100	200	200
	L	—	—	200	—	—	—	—	200	200	200
	M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	200	200	200
	R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	S	—	—	400	—	—	—	—	400	—	—
Castellani-Andrews (rasa)	A	—	—	—	—	—	800	800	—	—	—
	B	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Uwaga: Liczby wskazują rozcieńczenia surowic, w których odczyn wypadł wyraźnie dodatnio.

Szczepy pałeczek okrężnicy 1125, k, 543, d, 50 i 556 wykazujące wybitne odczyny w surowicach monowalentnych ras grupy Flexnera, poddaliśmy badaniu przy zastosowaniu surowic specyficznych (surowice uzyskane drogą absorbcji, aglutynujące jedynie szczepy homologicznej rasy). Wyniki zestawione są w tabeli 4.

Tabela 4.

Szczep. pałeczek okrężnicy	Surowice rasowo-swoiste grupy Flexner																
	A	BC	D ₁	D ₂	H	F	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂	L	M	N	O	P	R	S
1125	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
k	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
543	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
d	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
556	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Wyniki aglutynacji otrzymane z surowicami nieabsorbowanymi wykazały wyraźne powinowactwo serologiczne szczepów 1125 i d z rasą H grupy Flexner, zaś szczepy k, 543, 50 i 556 z rasą BC. Odczyny aglutynacyjne wykonane z surowicami absorbowanymi rasowo-swoistymi wykazały ponadto u tych szczepów obecność antygeny rasowo-swoistego BC i H charakterystycznego dla tych ras i spotykanych jedynie u przedstawicieli ras BC i H.

Równolegle z odczynem aglutynacyjnym wykonaliśmy odczyn wiązania dopełniacza z wysokowartościowymi surowicami durowo-paradurowymi i czerwinkowymi i zawiesinami badanych pałeczek okrężnicy (tabela 5).

Tabela 5.

Rodzaj surowicy	Szczep. pałeczek okrężnicy											
	Miano	51	m	1125	k	543	958	1950	d	50	556	
Paraduru A	640	—	—	—	20	—	—	—	—	—	—	—
B	1280	—	—	—	20	—	—	—	—	20	20	—
C	1280	80	40	80	640	80	—	—	320	640	640	—
Duru brz.	1280	—	—	—	640	—	—	—	—	160	80	—
Shiga-Kruse	320	40	40	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Schmitz	160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Flexner pol	x)	—	—	640	320	80	—	—	40	20	20	—
Kruse-Sonne	160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Castellani-Andrews pol.	x)	—	—	—	—	—	160	160	40	—	—	—

Uwaga: liczby wskazują rozcieńczenie surowicy, w której odczyn wiązania dopełniacza wypadł dodatnio.

- x) przy surowicach poliwalentnych miano waha się w zależności badanej rasy pałeczek grupy Flexnera.

Wyniki odczynu wiązania dopełniacza w zupełności zgodne z wynikami odczynu zlepnego wskazują dobitnie na duże powinowactwo antygenowe badanych szczepów pałeczek okrężnicy z pałeczkami czerwinkowymi i durowo-paradurowymi.

Obok poliwalentnych surowic czerwinkowych typu Flexner i Castellani-Andrews wykonaliśmy odczyn wiązania dopełniacza również z surowicami monowalentnymi rasy BC i H grupy Flexner oraz rasy A i B grupy Castellani-Andrews. Wyniki zestawione są w tabelach 5 a, b, c.

Tabela 5a.

Zawiesina	Surowica monow. Flexner BC rozcieńczona 1:							
	5	10	20	40	80	160	320	640
Bact. coli k	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
543	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
50	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
556	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Flexner BC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tabela 5b.

Zawiesina	Surowica monow. Flexner H rozcieńczona 1:							
	5	10	20	40	80	160	320	640
Bact. coli 1125	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
d	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
Flexner H	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tabela 5c.

Zawiesina	Surowica monow. Castellani-Andrews A. (Bact. madampensis rozcieńczona 1:							
	5	10	20	40	80	160	320	640
Bact. coli 958	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1950	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Castellani-Andrews A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tabela 5d.

Zawiesina	Surowica monow. Castellani-Andrews B (Bact. dispar) rozcieńczona 1:							
	5	10	20	40	80	160	320	640
Bact. coli d	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Castellani-Andrews B.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

Jak z powyższych zestawień wynika odczyn wiązania dopełniacza w surowicach monowalentnych wypada dodatnio w dość znacznych rozcieńczeniach surowicy.

Jako uzupełnienie wykonaliśmy absorbcję aglutynin surowic, z którymi badane szczepy pałeczek okrężnicy dały wybitnie dodatnie wyniki w odczynie aglutynacyjnym i wiązania dopełniacza.

Następujące zestawienia wskazują nam wyniki absorbcji aglutynin w poszczególnych surowicach.

Tabela 6a.

aglutynuje ze szczepem	nieabsorb.	Surowica paraturu C absorbowana szczepem:								
		PC	51	m	1125	k	543	d	50	556
Paraturu C	1600 *)	—	800	1200	800	100	800	1200	200	200
Bact. coli 51	400	—	—	50	—	—	—	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1600	—	800	800	400	—	400	400	—	—
	400	—	—	—	50	—	—	—	—	—
	400	—	—	—	50	—	—	—	—	—
	1600	—	400	400	800	—	400	400	—	—
	1600	—	400	400	800	—	400	400	—	—

Uwaga: *) Uwzględniono jedynie miano dla aglutynin O

Liczby wskazują rozcieńczenia surowicy, w których po absorbcji odczyn aglutynacyjny wypadł jeszcze wyraźnie dodatnio.

Tabela 6b.

aglutynuje ze szczepem	nieabsorb.	Surowica duru brzuszego absorb. szczepem:			
		ty	k	50	556
Duru brz. O 901	3200	—	1600	2400	2400
Bact. coli k	800	—	—	—	—
50	400	—	—	—	—
556	400	—	—	—	—

Tabela 6c.

aglutynuje ze szczepem	nieabsorb.	Surowica czerwinkowa Shiga-Kruse absorbowana szczepem:		
		Shiga-Kruse	51	m
Shiga-Kruse	3200	—	800	800
Bact. coli 51	800	—	—	—
m	800	—	—	—

Tabela 6d.

aglutynuje ze szczepem	nieabsorb.	Surowica Flexner B C absorbowana szczepem:				
		B C	k	543	50	556
Flexner B C	6400	—	800	3200	1600	1600
Bact. coli k	3200	—	—	400	200	200
543	400	—	—	—	—	—
50	1600	—	—	200	—	—
556	1600	—	—	200	—	—

Tabela 6e.

aglutynuje ze szczepem	nieabsorb.	Surowica Flexner H absorbowana szczepem:		
		H	1125	d
Flexner H	6400	—	800	1600
Bact. coli 1125	3200	—	—	200
d	1600	—	—	—

Tabela 6f.

aglutynuje ze szczepem	nieabsorb.	Surowica Castellani-Andrews A (Bact. madampense) absorbowana szczepem:		
		dispar A	958	1950
Castellani-Andrews A.	1600	—	400	400
Bact. coli 958	800	—	—	—
1950	800	—	—	—

Tabela 6g.

aglutynuje ze szczepem:	nieabsorb.	Surowica Castellani-Andrews B. (Bact. dispar) absorbowana szczepem:	
		dispar B	d
Castellani-Andrews B.	3200	—	1600
Bact. coli d	400	—	—

Jak z powyższych zestawień wynika pałeczki okrężnicy absorbują z surowic durowo-paradurowych i czerwonych część aglutynin dla powyższych gatunków bakteryjnych. Stopień wysycenia naogół idzie proporcjonalnie do wysokości miana aglutynacyjnego. Nierównomierne wysycanie poszczególnych surowic przez różne pałeczki okrężnicy świadczyć by mogło o różnicach ilościowych w odniesieniu do wspólnych antygenów, możliwym jednakże wydaje się, że różnice te mogą zależeć od jakościowo odmiennych składników we wspólnych kompleksach antygenowych.

Celem określenia charakteru chemicznego wspólnych składników antygenowych wyodrębniliśmy u niektórych szczepów pałeczek okrężnicy (*Bact. coli* 51, 1125. d, 556 i 958) frakcje antygenowe w postaci wielocukrów bakteryjnych.

Dla przejrzystości podajemy sposób otrzymywania frakcji antygenowych:

1. frakcja wielocukrowo-lipoidowa wdg. Boivin i Mesrobianu.

Zawiesinę bakteryjną w wodzie destylowanej kilkakrotnie przepłukaną o gęstości 200 mg. w ccm. miesza się z równą objętością $1/2$ n. kwasu tróchlorooctowego; po 3-godzinnym trzymaniu w chłodni zawiesinę odwirowuje się, płyn z nad osadu zawierający frakcję wielocukrowo-lipoidową odpipe-towuje i celem usunięcia kwasu tróchlorooctowego dializuje przez celofan.

2. frakcja wielocukrowa zasadowa wdg. Pflügera w modyfikacji Mikulaszka.

Do gęstej zawiesiny w wodzie destylowanej dodaje się ługu sodowego in substancia tak, by otrzymać 30% roztwór; następnie zawiesinę gotuje się przez godzinę, po ochłodzeniu wielocukier, znajdujący się w roztworze wytrąca się podwójną ilością alkoholu 96%. Oczyszczanie wielocukru odbywa się drogą wytrącania go alkoholem z roztworów kwaśnych i zasadowych na przemian (w granicach 1% kwasu octowego i 30% ługu sodowego) w końcu z roztworu obojętnego.

3. frakcja wielocukrowa kwaśna wdg. Zinser-Parkera

Zawiesinę gęstą w wodzie destylowanej odbiałcza się na gorąco 10% kwasem octowym; po godzinnym gotowaniu zawiesinę przesącza się przez bibulę; wielocukier znajdujący się w roztworze wytrąca się różnymi stężeniami alkoholu 96% (przy stężeniu 60% alkoholu wypada frakcja I, zaś przy nadmiarze frakcja II).

Dokładniejsze dane odnośnie do cech fizyko-chemicznych powyższych frakcji antygenowych zawiera wyczerpująca monografia E. Mikulaszka „O wielocukrach bakteryjnych“ Lwów 1935.

Co się tyczy charakteru serologicznego badanych frakcji antygenowych to frakcja wielocukrowo-lipoidowa jest antygenem pełnowartościowym; pozostałe frakcje są antygenami resztkowymi.

Z otrzymanymi frakcjami antygenowymi wykonaliśmy odczyn wiązania dopełniacza w surowicach, które dawały silnie dodatnie odczyny aglutynacyjne i wiązania dopełniacza z pełnymi komórkami szczepów pałeczek okrężnicy, z których dane frakcje przygotowano.

Przy nastawianiu odczynu wiązania dopełniacza rozcieńczano badaną frakcję antygenową od 1:1000 do 1:500.000, zaś surowicę używano stale w rozcieńczeniu 1:10.

Obok odczynu głównego nastawiano cały szereg kontrolnych odczynów, których dla przejrzystości w tabelach nie umieszczono.

Otrzymane wyniki zestawione są w następujących tabelach.

Tabela 7a.

Bact. coli 51 frakcja:	S u r o w i c a:	
	Paraduru C	Shiga-Kruse
wielocukrowo-lipoid. . . .	4000	64000
zasadowa	500000	64000
kwaśna I	125000	125000
kwaśna II	8000	125000

Tabela 7b.

Bact. coli 1125 frakcja:	S u r o w i c a:	
	Paraduru C	Flexner H
wielocukrowo-lipoid. . . .	8000	500000
zasadowa	8000	500000
kwaśna I	8000	32000
kwaśna II	2000	4000

Tabela 7c.

Bact. coli d frakcja:	S u r o w i c a:	
	Paraduru C	Flexner H
wielocukrowo-lipoid. . . .	32000	125000
zasadowa	32000	32000
kwaśna I	32000	0
kwaśna II	125000	0

Bact. coli d frakcja:	Castellani-Andrews B.
wielocukrowo-lipoid. . . .	3 2 0 0 0
zasadowa	0
kwaśna I	0
kwaśna II	0

Tabela 7d.

Bact. coli 956 frakcja:	S u r o w i c a:	
	Paraduru C	Flexner BC
wielocukrowo-lipoid. . . .	500000	32000
zasadowa	250000	64000
kwaśna I	64000	8000
kwaśna II	16000	4000

Bact. coli 556 frakcja:	D u r u b r z u s z n e g o
wielocukrowo-lipoid	8 0 0 0
zasadowa	1 6 0 0 0
kwaśna I	4 0 0 0
kwaśna II	4 0 0 0

Tabela 7e.

Bact. coli 958 frakcja:	S u r o w i c a :
	Castellani-Andrews A (Bact. madampensis)
wielocukrowo-lipoid.	3 2 0 0 0
zasadowa	1 6 0 0 0
kwaśna I	8 0 0 0
kwaśna II	2 0 0 0

Uwaga: Liczby wskazują rozcieńczenia frakcji antygenowych, które dały dodatni odczyn wiązania dopełniacza.

Przystępując do omówienia wyników odczynu wiązania dopełniacza z frakcjami antygenowymi badanych szczepów pałeczek okrężnicy stwierdzić należy, że wszystkie otrzymane przez nas frakcje dawały odczyny serologiczne, czyli były serologicznie czynnymi.

Jak widzimy otrzymane przez nas frakcje wielocukrowe pałeczek okrężnicy dają w surowicach czerwonych i durowo-paradurowych wybitnie dodatnie odczyny wiązania dopełniacza dochodzące do rozcieńczeń antygenu 1,500.000. Jeśli chodzi o zachowanie się poszczególnych frakcji to najbardziej czynną okazała się frakcja wielocukrowo-lipoidowa, następnie wielocukier otrzymany metodą zasadową i frakcja I wielocukru otrzymanego metodą kwaśną, najsłabsze zaś odczyny dała frakcja II wielocukru otrzymanego metodą kwaśną.

Wyniki powyższe byłyby dalszym dowodem pokrewieństwa antygenowego pałeczek okrężnicy i pałeczek durowo-paradurowych i czerwonych. Wskazywałyby nadto, że składnikiem warunkującym to powinowactwo są połączenia o charakterze wielocukrów bakteryjnych.

2. Zachowanie się surowic pałeczek okrężnicy wobec szczepów pałeczek durowo-paradurowych i czerwonych.

Surowice odpornościowe otrzymaliśmy drogą uodparniania królików szczepami pałeczek okrężnicy 1125 i 556. Uodparnialiśmy dożylnie zawiesiną 24 godzinnej hodowli agarowej pałeczek okrężnicy zabitych przez ogrzanie przy 58–60° C w ciągu godziny, zaczynając od 150 milionów drobnoustrojów w cm; następne dawki wynosiły 250, 400, 500, 750 i 1000 milionów drobnoustrojów w cm. Odstępy między iniekcjami 3-dniowe, w tydzień po ostatniej dawce kontrola i wykrawanie zwierzęcia. W obu wypadkach otrzymaliśmy bez trudu wysokowartościowe surowice aglutynujące i wiążące dopełniacz.

Na wstępie wykonaliśmy odczyn aglutynacyjny ze wszystkimi badanymi szczepami pałeczek okrężnicy. Otrzymane wyniki zebrane są w tabeli 8 a.

Tabela 8a

Surowica:	Szczep pałeczek okrężnicy									
	51	m	1125	k	543	958	1950	d	50	556
1125	—	400	12800	400	—	—	—	3200	400	400
556	200	—	400	3200	1600	—	—	—	12800	12800

Uwaga: Liczby wskazują rozcieńczenia surowic, w których odczyn aglutynacyjny wypadł wyraźnie dodatnio.

Wyniki powyższe wskazują na niejednolity charakter antygenowy pałeczek okrężnicy. Wyniki te zgodne są ze spostrzeżeniami innych autorów odnośnie do istnienia licznych podgrup serologicznych pałeczek okrężnicy. Pewne pokrewieństwo zaznacza się między szczepami 1125 i d z jednej, a k, 543, 50 i 556 z drugiej strony, co już dało się zauważyć w zachowaniu się tych szczepów w surowicach czerwonych zwłaszcza w surowicach Flexner BC i H.

Pałeczki durowo-paradurowe aglutynują w ob. surowicach bardzo słabo (tab. 8 b).

Tabela 8b.

Surowica:	Szczep pałeczek durowo-paradurowych:			
	Paraduru A	B	C	durowo brzuszego
1125	—	—	200	100
556	—	—	200	100

Z pałeczek czerwonych pałeczki Shiga-Kruse, Schmitz, Kruse-Sonne, Castellani-Andrews dają z powyższymi surowicami wyniki ujemne. Z pośród pałeczek grupy Flexner, rasy A, BC i H dają w porównaniu z innymi rasami szczególnie wybitne odczyny aglutynacyjne (tabela 8 c.).

Tabela 8c.

Surowica:	Pałeczki czerwinkowe typu Flexnerasy:														
	A	BC	D ₁	D ₂	H ₁	H ₂	F	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂	L	M	N	S
1125	3200	800	800	100	6400	800	800	800	800	400	800	-	-	-	400
556	400	3200	400	400	100	400	200	200	100	200	200	-	-	-	100

Celem wyjaśnienia powinowactwa poszczególnych ras pałeczek Flexnera wykonaliśmy absorbując aglutynin obu surowic przez przedstawicieli wszystkich ras grupy Flexner.

Otrzymane wyniki przedstawiają nam tabele 9 a i b.

Tabela 9a.

aglutynuje ze szczepem:	Surowica 1125 absorbowana szczepami:																
	1125	A	BC	D ₁	D ₂	H ₁	H ₂	F	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂	L	M	N	O	S
Bact. coli 1125	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bact. Flexner A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Wyniki absorbcji aglutynin surowicy 1125 potwierdzają nam w zupełności poprzednie dane (aglutynacja w surowicach rasowo-swoistych), że wspólnym składnikiem szczepu okrężnicy 1125 i pałeczek Flexner rasy H jest kompleks antygenowy nadający rasie H grupy Flexner cechy charakterystyczne-rasowe, a który przy analizie antygenowej pałeczek czerwonych grupy Flexner określiliśmy jako antygen rasowy V. Ponadto wspólnymi są jeszcze antygeny o charakterze grupowym.

Podobnie przedstawia się sprawa jeśli chodzi o szczep okrężnicy 556 i pałeczki rasy BC. Szczep ten zawiera antygen identyczny z antygenem rasowym BC oznaczonym przez nas jako II.

W obu surowicach wykonaliśmy również odczyn wiązania dopełniacza z pełnymi komórkami i frakcjami antygenowymi szczepów wykazujących wybitne pokrewieństwo ze sobą.

Wyniki przedstawione są w tabelach 10 a i b.

Tabela 10 a.

S z c z e p	S u r o w i c a 1 1 2 5							
	5	10	20	40	80	160	320	640
Bact. coli 1125	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Bact. paratyphi C	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Bact. Flexner H	+++	+++	++	+	—	—	—	—

Uwaga: Liczby wskazują rozcieńczenia surowicy.

Frakcje antygenowe:	S u r o w i c a 1 1 2 5		
	Coli 1125	Flexner H	Paraduru C
wielocukr. lip	500000	64000	16000
zasadowa	250000	64000	32000
kwaśna I	32000	32000	8000
kwaśna II	16000	16000	4000

Uwaga: Liczby wskazują rozcieńczenia frakcji antygenowych, które dały dodatni odczyn wiązania dopełniacza.

Tabela 10b

S z c z e p	S u r o w i c a 5 5 6							
	5	10	20	40	80	160	320	640
Bact. coli 556	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Duru brz. O 901	+++	+++	++	+	—	—	—	—
Paraduru C	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
Flexner BC	+++	+++	+++	++	+	—	—	—

Tabela 10c.

Fracje antygenowe	S u r o w i c a 5 5 6			
	Coli 556	Duru brz.	Paraduru C	Flexner BC
wielocukr. lipid.	500000	16000	8000	64000
zasadowa	250000	16000	16000	64000
kwaśna I	32000	4000	16000	8000
kwaśna II	32000	4000	16000	8000

Wyniki odczynów wiązania dopełniacza z pełnymi antygenami komórkowymi potwierdzają nam w zupełności wyniki odczynu aglutynacyjnego. Szczepy paraduru C i duru brzusz- nego dają tu nieco wyraźniejsze wyniki niż w odczynie aglu- tynacyjnym.

Wyniki odczynów wiązania dopełniacza z frakcjami anty- genowymi wskazują jeszcze raz, że wspólny składnik pałeczek okreźnicy i pałeczek czerwonych oraz duru-paraduro- wych ma charakter wielocukru bakteryjnego, bądź to jako połączenie wielocukrowo-lipoidowe, bądź jako wolny wielo- cukier o charakterze antygenu reszkowego.

Nasilenie odczynu wiązania dopełniacza przy frakcjach antygenowych pałeczek duru brzusznego i paraduru C w po- równaniu z odczynami wiązania dopełniacza z pełnymi ko- mórkami i odczynem aglutynacyjnym wskazuje, że wspólny składnik t. j. wielocukier bakteryjny tkwi nieco głębiej w komórce.

Streszczenie i wnioski:

Korzystając z obfitego materiału diagnostycznego czerwonego w latach 1941—43, postanowiliśmy zająć się bliżej zagadnieniem paraglutynacji szczepów pałeczek okrężnicy w surowicach czerwonych. W 10 przypadkach wyizolowaliśmy szczepy bact. coli, morfologicznie i biochemicznie odpowiadające typowym pałeczkom okrężnicy, serologicznie wykazujące wybitne pokrewieństwo z pałeczkami czerwinkowymi i durowo-paradurowymi. Badania przeprowadzono w dwu kierunkach. Po pierwsze skontrolowano zachowanie się badanych szczepów pałeczek okrężnicy w wysokowarściowych surowicach czerwonych (surowice: Shiga-Kruse, Flexner poliv. i monoval. ras A, BC, D₁, D₂, H₁, H₂, F, X₁, X₂, Y₁, Y₂, L, M, N, O, P, R, S; Kruse-Sonne, Castellani-Andrews poliv. i monoval. ras A, B, C, D) i durowo-paradurowych (surowice: typhi abd., paratyphi A, B, C). Odczyn aglutynacyjny i wiązania dopełniacza wypadły w dość znacznych rozcieńczeniach surowic, dochodząc niejednokrotnie do miana surowicy heterologicznej. Szczególnie wysokie miana stwierdzano przy surowicy Shiga-Kruse, Flexner poliv. i monowalentnych BC i H, Castellani-Andrews poliv. i monoval. A i B, oraz surowicach paraduru C i duru brzuszego. Niektóre szczepy dawały dodatnie odczyny z jedną, inne z kilkoma surowicami (np. z surowicą Flexner, paraduru C i duru brzuszego). Na szczególniejszą uwagę zasługują wyniki aglutynacji w surowicach rasowych ras BC i H grupy Flexner. Surowice te uzyskane drogą absorpcji, aglutynujące jedynie szczepy homologicznej rasy, aglutynowały również niektóre spośród badanych szczepów pałeczek okrężnicy.

W odczynie absorbcyjnym szczepy te wysycaly jedynie część aglutynin z surowic heterologicznych.

Odczyny wiązania dopełniacza wykonane z frakcjami antygenowymi (fr. wielocukrowo-lipoidowa, według Boivin i Mesrobianu, fr. zasadowe według Pflügera, fr. kwaśne według Zinser-Parkera) otrzymanymi z badanych szczepów pałeczek okrężnicy wypadły dodatnio nawet w rozcieńczeniach 1:500.000. Wskazywało by to, iż wspólnym składnikiem warunkującym pokrewieństwo antygenowe badanych szczepów pałeczek okrężnicy z jednej, a pałeczek czerwinkowych i tyfowo-paratyfusowych z drugiej strony są wielocukry bakteryjne.

Następnie przebadano zachowanie się surowic wysoko-wartościowych otrzymanych drogą uodparniania królików paraglutynującymi szczepami pałeczek okrężnicy.

Odczyn aglutynacji z homologicznymi szczepami wypada silniej, niż z innymi szczepami pałeczek okrężnicy, co potwierdzało by niejednolity charakter serologiczny grupy pałeczek okrężnicy.

Z pałeczek czerwonych szczególnie silnie aglutynują te szczepy, których surowice aglutynowały odnośne szczepy *bact. coli*.

Pałeczki grupy durowo-paradurowej aglutynują naogół słabo. Szczególnie silne odczyny wykazuje odczyn wiązania dopełniacza nastawiany z frakcjami antygenowymi wielocukrowymi i wysokowartościowymi surowicami pałeczek okrężnicy. Nasilenie odczynu przy frakcjach antygenowych pałeczek durowych i paraduru C wskazywało by, iż wspólny składnik t. j. wielocukier bakteryjny tkwi nieco głębiej w komórce.

Badania te wskazują, iż komórki drobnoustrojów pod względem budowy antygenowej przedstawiają mozaikę złożoną z dużej ale i ograniczonej ilości cegiełek. Cegiełki te rozmieszczone są w różnym ugrupowaniu w poszczególnych drobnoustrojach. W jednym gatunku mogą one odgrywać rolę antygenu typowego, rasowego, w drugim zaś mają jedynie charakter antygenu grupowego. Przeważnie są to związki o charakterze wielocukrów bakteryjnych.

THE ANTIGENIC SIMILARITY OF THE COLON GROUP BACTERIA AND BACTERIA OF SALMONELLA AND DYSENTERY GROUP

KURYŁOWICZ W., ŚLOPEK S.

Based on our diagnostical material of numerous dysentery cases observed during the world war II in 1941—43, we have investigated with more details the problem of the paraggglutination of the strains of *Bact. coli* by the dysentery sera. In 10 cases we have isolated strains of *Bact. coli* being identified morphologically as well as biochemically as typical *Bact. coli*, but showing the striking serological similarity to the dysentery and typhoid and paratyphoid bacterias.

The experiments were carried out in two directions: 1. First we investigated features of the strains in the reaction with the high-titer dysentery sera (Shiga-Kruse, Flexner

polyv., and monoval. A, BC, D₁, D₂, H₁, H₂, F, X₁, X₂, Y₁, Y₂, L, M, N, O, P, R, S, Kruse-Sonne, Castellani-Andrewes polyv. and monoval. A, B, C, D), as well as in typhoid-paratyphoid sera (typhoid, paratyphoid A, B, C).

The results of the agglutination — and complement fixation reactions were positive till pretty high dilutions of the sera, some of them beeing as high as heterological sera. Especially high titers have been found with the sera Shiga-Kruse, Flexner polyv. and monoval BC and H, Castellani-Andrewes polyv. and monoval. A and B, as well as with the paratyphoid C and typhoid serum.

Some of the strains have given the positive reaction results with one only, others with several sera (e. g. Flexner, paratyphoid C and typhoid serum).

We should especially point out, that the sera of the BC race and H race of the Flexner group, beeing obtained by absorbtion, giving no agglutination but with the strains of the homologic race, have also given agglutination of some of our Bact. coli strains.

These strains with the flocculum have absorbed only a portion of the agglutinins out of the heterologic sera.

The complement fixation reactions with the antigen fractions (polysaccharid - lipid fraction accordingly to Boivin and Mesrobeanu, basic fraction accordingly to Pflüger, acid fraction accordingly Zinsser and Parker) obtained from our Coli strains gave positive results up to the dilution 1:500.000. This would show that the common part, which causes the antigenic similarity between Bact. coli strains on one side and the Dysentery-typhoid-paratyphoid bacterias on the other side is polysaccharidic in nature.

2. Secondly the features of the high titer sera (obtained by immunizing rabbits by means of our paraggglutinating Coli strains) have been investigated.

The results of the agglutination reaction with the homologic strains were more accentuated than these made with the other Coli strains. It would confirm the complex serological nature of the Coli group.

Among the Dysentery group the most accentuated agglutination was shown by strains, the sera of which gave the graetest agglutination of our Coli strains. The typhoid-paratyphoid bacteria give lesser agglutination.

The positive results of complement fixation reaction with the polysaccharidic antigen fractions and the high potent Coli sera were especially accentuated. The intensity of the

reaction in the case of antigen fractions of Typhoid-paratyphoid bacteria would show that the common part i. e. bacterial polysaccharide is located in a deeper part of the cell

The above experiments show that the microorganism cells have mosaic like antigenic structure, which consists of a large, but still limited quantity of building units.

The units are placed in different combinations in different microorganisms. They may function as type-race antigen in certain strains, but only as group antigen in other ones. They are mostly polysaccharide in nature.

PIŚMIENNICTWO

1. Almagia M.: Ann. D Ig. 1919, 29, 685.
2. Amalfitano G.: Giorn. Batter. 1935, 15, 84.
3. Baerthlein K.: Zbl. f. Bakt. Or. I. 1915, 77, 272.
4. Breinl F.: Z. f. Imm. 1921, 31, 1.
5. Busson B.: Zbl. f. Bakt. Or. I. 1914, 73, 328.
6. Duval C. W., Shorer E. H.: Stud. Rockefeller Inst. Med.
7. Ebeling E.: Z. f. Hyg. 1913, 74, 447.
8. Egyedi H., Kulka W.: W. kl. W. 1925, 1031.
9. Engering P.: Zbl. f. Bakt. Or. I. 1924, 92, 1.
10. Flatzek A.: D. m. W. 1916, 200.
11. Gotschlich K.: Handb. d. path. Mikroorg. III. Aufl. Bd. I. 230.
12. Hayashi K.: Z. f. Imm. 1938, 93, 137.
13. Kuhn: A. f. Hyg. 1916, 86.
14. Kuhn: Med. kl. 1916, 791.
15. Kuhn: Zbl. f. Bakt. Or. I. 1917, 80, 107.
16. Kuhn, Ebeling E.: Z. f. Imm. 1915, 35, 1.
17. Kuhn, Gildemeister, Woitthe: Arb. d. Kais. Ges. Amt. 1911, 31.
18. Kuhn, Gildemeister, Woitthe: Arb. d. Kais. Ges. Amt. 1912, 32.
19. Kuhn, Woitthe: Med. Kl. 1909, 45.
20. Kuryłowicz W., Mikulaszek E., Słopek St.: O mechanizmie odczynu Weil-Fekixa (w druku).
21. Lentz O., Prigge R.: Handb. d. path. Mikroorg. III Aufl. Bd. III, 1377, 1931.
22. Mackie Th. T.: J. of. Bact. 1939, 37, 27.
23. Manteufel P.: Z. f. Hyg. 1915, 79, 319.
24. Ornstein M.: Z. f. Hyg. 1920, 91, 52.
25. Otto R., Sukiennikowa N.: Z. f. Hyg. 1923, 101, 119.
26. Silberstein W.: Z. f. Hyg. 1930, 111, 79.
27. Simizu: Jap. J. of. exp. Med. 1939, 17, 95.
28. Kuryłowicz W., Słopek St.: Med. dośw. i społ. 1946 str. 112.
29. Kuryłowicz W., Słopek St.: Med. dośw. i społ. 1946 str. 114.

Z Państwowego Zakładu Higieny
Nacz. Dyrektor: Prof. Dr F. Przesmycki.

Z HISTOLOGII I HISTOFIZJOLOGII KOMARA ANOPHELES MACULIPENNIS, NOSICIELA MALARII W POLSCE

BRONISŁAWA KONOPACKA

Praca niniejsza została wykonana w pracowni parazytologicznej Działu Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie w związku z nastawieniem tej pracowni w latach wojennych 1942—1944 głównie na zwalczanie malarii. Wydawało mi się, że zbadanie metodami histochemicznymi cyklu rozwojowego i metabolizmu sezonowego komara dorosłego może przyczynić się do dokładniejszego poznania jego biologii. Wzorowałem się na kierunku badań, zapoczątkowanym przez Fauré Fremiet (1910) i M. Konopackiego (1924, 1926), którzy zastosowali metody te do badania rozwoju zwierząt, kierunku, który, prowadzony równolegle do badań mikrochemicznych, przyczynił się w dużej mierze do wyjaśnienia chemizmu rozwoju.

Postawiłam więc sobie za zadanie zbadanie tymi metodami przebiegu rozwoju komara oraz sądziłam, że zastosowanie ich w różnych okresach życia komara dorosłego może rzucić światło na czynności i znaczenie jego narządów, głównie tak zwanego ciała tłuszczowego, narządu, którego rola w fizjologii owadów nie jest jeszcze dokładnie wyświetlona.

Material

W tym celu zbierałam materiał z komarów, wyłącznie *Anopheles maculipennis*, w różnych okresach roku. Zbieranie materiału trwało dwa lata. W pierwszym roku utrwalalam komary w miarę dostarczania ich do pracowni w miesiącach letnich, jesiennych, zimowych i wiosennych, a po opracowaniu zebranego materiału, uzupełniłam w roku następnym brakujące stadia i w ten sposób uzyskałam utrwalone komary ze wszystkich miesięcy całego roku.

Świeżo złapane komary dzieliłam na kilka porcji i każdą z nich utrwalalam w innym odczynniku, ażeby móc badać w nich obecność różnych substancji. W sumie zbadałam przeszło trzysta komarów, larw i poczwarek.

Preparaty zrobione z nich zostały przejrzone i opisane. Niestety większość preparatów i część notatek została zniszczona w Warszawie w 1944 r. Nie mogę więc na razie dołączyć rysunków ani dać tablicy porównawczej. Praca niniejsza jest więc tylko doniesieniem tymczasowym, a opracowanie dokładne tego tematu pozostawiam do czasu, kiedy nastąpią takie warunki, iż można będzie raz jeszcze zdobyć materiał i dokończyć jego opracowanie.

Metody

Stosowałam metody na wykrycie trzech głównych substancji, występujących w ciele zwierząt, a więc ciał białkowych, tłuszczowych i tłuszczowatych oraz glikogenu. Na ograniczenie to wpłynął fakt, iż komar jest obiektem bardzo trudnym do badań histologicznych ze względu na bardzo delikatne tkanki zawarte w pancerzu chitynowym trudno przepuszczalnym dla odczynników. Wszystkie metody należało modyfikować i dostosowywać tak, aby pokonać trudności związane z materiałem.

Dla wykrywania tłuszczów stosowałam metodę, która dawała doskonałe wyniki w moich pracach poprzednich nad rozwojem ptaków i ryb (1931, 1934 i 1937), to jest utrwalanie w formalinie rozcieńczonej roztworem fizjologicznym soli kuchennej, izotonicznym dla zwierząt bezkręgowych, zatapianie w żelatynie, krajanie na mikrotomie zamrażającym, barwienie skrawków Sudanem III i podbarwianie hemalaunem. Stosowałam także metodę Ciaccio na wykrywanie ciał tłuszczowatych.

W celu wykrywania glikogenu utrwalalam komary w płynie Barka (formol z alkoholem absolutnym), płynie Carnoy i innych. Najlepsze rezultaty otrzymałam po barwieniu karminem według Besta i podbarwianiu błękitem lionńskim oraz metodą Bauera (chromowanie skrawków po tych samych utrwalaczach, a następnie barwienie odczynnikiem Schiffa według Feulgena.

Substancje białkowe barwiły się doskonale po metodzie Ciaccia oraz były bardzo dobrze uwidocznione błękitem lionńskim na preparatach przygotowanych w celu wykrycia glikogenu. Na jednym i tym samym skrawku kuki białkowe były doskonale zachowane obok kropel glikogenu, co daje obrazy bardzo instruktywne.

staci albo dość dużych kropli, albo w postaci rozlanej, wypełniając w komórkach przestrzenie między kulkami białka i kroplami tłuszczu. Te substancje tak wypełniają komórki, że cytoplazma tworzy cienkie smugi pomiędzy nimi a większe skupienia tylko dokoła jąder.

W larwach starszych ciało tłuszczowe nie jest ograniczone do dwóch płatów, lecz tworzy liczne skupienia komórek wciśkające się pomiędzy prawie wszystkie narządy. Na ogół obrazy histochemiczne wskazują na bardzo intensywną przemianę materii u larw starszych. Żołądek, wypełniony resztkami trawionych alg, zawiera w swych komórkach liczne kropelki glikogenu. Kropelki te znajdują się w podstawowych częściach komórek poniżej jąder, które leżą w centrum komórek. Wskazuje to na czynny udział komórek tego nabłonka w procesie wytwarzania i przenoszenia glikogenu. Jeszcze bardziej intensywna przemiana materii zachodzi w komórkach rurek Malpighiego, narządów wydzielniczych, które u larw są już dobrze wykształcone. Komórki te są wypełnione ziarnkami białkowymi i kroplami barwiącymi się tak jak glikogen.

Oczy larw są dobrze wykształcone. Są to oczy złożone, w których w każdym oczku znajduje się duża kropla glikogenu. W zwojach nerwowych komórki nerwowe zawierają także glikogen.

Poczwarki

W stadium tym następuje przekształcenie w owada dorosłego. Zachodzą tu procesy prowadzące do wytworzenia nówek i skrzydeł, uformowanie części pyszczkowych i czułków, wyodrębnienie głowy, przekształcenie przewodu pokarmowego, wytworzenie definitywnych mięśni itp. Stan ciała tłuszczowego poczwarek jest różny w poszczególnych poczwarkach zależnie od tego, czy dana poczwarka została utrwalona w okresie wcześniejszym czy późniejszym swego istnienia (stadium poczwarki trwa 3—7 dni zależnie od temperatury Brumpt 1927). Objętość ciała tłuszczowego zmniejsza się stopniowo, a substancje zapasowe zostają w nim zużywane. Komórki tego ciała biorą czynny udział w procesie przepoczwarczania się, polegającym zarówno na procesach rozpadowych jak i twórczych. Komórki te widzi się w takich miejscach, w jakich w larwie i komarze dorosłym nie występują nigdy. Wnikają bowiem między rozluźnione wiązki mięśni, ulegających przekształceniu. Mięśnie ulegają częściowej autolizie począwszy od miejsc przyczepu do nabłonka zewnętrznego. Zanikające w nich włókienka mięsne są otoczone kropel.

kami glikogenu, a komórki ciała tłuszczowego leżą w przestrzeniach między nimi. Zawierają one w sobie duże ilości glikogenu, który uwalnia się tu i zostaje przez nie pochłonięty. W oczach poczwarki nie zachodzą większe zmiany, i komórki wzrokowe zawierają nadal glikogen. W jelicie poczwarek nie ma substancji przenikających przez komórki nabłonka, co stoi w związku z ustaniem przyjmowania pokarmu. Rurki Malpighiego funkcjonują przez cały okres przepoczwarczania się, na co wskazuje stan komórek wypełnionych kulkami białkowymi a także kroplami substancji barwiącej się podobnie jak glikogen. W wyrastających w tym czasie nóżkach glikogen znajduje się w nabłonku pod chityną i w mięśniach.

W poczwarkach w końcowym okresie, kiedy głowa i tułów komara są już uformowane, ciało tłuszczowe w tułowie jest zredukowane do jednej warstwy komórek prawie płaskich, leżących pod nabłonkiem zewnętrznym i zawierających znikomą ilość zarówno ziarenek białkowych jak kropeł tłuszczu i glikogenu. W ogonie natomiast, który jeszcze wykonywa ruchy i ma uleść przekształceniu, ciało tłuszczowe składa się z dużej ilości komórek wypełnionych substancjami zapasowymi, a zwłaszcza glikogenem.

Komary dorosłe

Komary dorosłe z lata wykazują także objawy bardzo intensywnej przemiany materii.

Substancje tłuszczowe. Z narządów, mózg i zwoje nerwowe komarów utrwalanych we wszystkich miesiącach wykazywały lekkie zabarwienie Sudanem III. Jest to objaw zwykły u zwierząt posiadających wysoko wykształcony system nerwowy centralny, że lipidy jego barwią się tą metodą.

U samiec w jajnikach, jajka wykazują obecność dużej ilości substancji tłuszczowych. W żołądku i jelicie nie dało się ich wykazać.

Duże ilości substancji tłuszczowych gromadzą się natomiast w ciele tłuszczowym, którego komórki są nimi naładowane.

Glikogen. Można go wykryć w nabłonku przewodu pokarmowego, zwłaszcza w nabłonku początkowej rozszerzonej jego części zwanej „wołem“, a u samców i w nabłonku żołądka, podobnie jak u larw. Stoi to w związku z procesem trawienia pokarmów.

W jajach glikogenu wykryć się nie dało. Znajduje się on w oczach podobnie u larw jak i poczwarek.

W ciele tłuszczowym glikogen znajduje się także w postaci kropeł dużych, równających się pod względem wielkości kroplom tłuszczowym, lub w postaci rozlanej wśród cytoplazmy komórek.

Substancje białkowe dadzą się wykryć w postaci ziarenek drobniejszych niż krople tłuszczowe i glikogenowe w komórkach ciała tłuszczowego.

Uderzający był fakt, że ciało tłuszczowe nie we wszystkich komarach było jednakowo rozwinięte. W komarach letnich, pochodzących z jednego i tego samego miesiąca, a nawet z jednego połowu, stan ciała tłuszczowego był bardzo rozmaity. Jedne komary posiadały ciało tłuszczowe bardzo duże, zawierające znaczne ilości badanych substancji, w innych było ono w postaci zredukowanej. Wobec tego nasunęła się konieczność poświęcenia specjalnego badania ciała tłuszczowemu.

Ciało tłuszczowe

Jest to twór, występujący u owadów, którego znaczenie jest dotąd niezupełnie wyjaśnione. Z literatury (Schreder 1939) wiemy, że składa się ono z komórek o kształtach nieregularnych, zawierających tłuszcz, glikogen i białko. Pomiedzy komórkami naładowanymi tymi substancjami leżą komórki nie zawierające żadnych zawartości. Preparaty moje potwierdziły te dane; mogłam stwierdzić, że ciało tłuszczowe tworzy nieregularne skupienia komórek, nie odgraniczone od otoczenia żadną torebką ani osłonką. Skupienia te tworzą rodzaj powłoki pomiędzy nabłonkiem zewnętrznym pokrytym chityną a narządami wewnętrznymi w głowie, tułowiu i odwłoku. Powłoka ta składa się z jednej lub kilku warstw komórek.

Robione były próby określenia znaczenia ciała tłuszczowego np. w procesie przepoczwarczania się u mącznika (Z. Zakolska 1921), lecz stwierdzone zostało, że z zachowania się jego żadnych konkretnych wniosków wyprowadzić się nie da.

Istotnie robiąc preparaty z komarów łapanych przypadkowo w różnych miesiącach na wiosnę i w lecie, nie można było wykryć żadnej prawidłowości w jego zachowaniu. Nasunęło się przypuszczenie, że stoi ono w związku z metabolizmem komara.

Porównyując stan ciała tłuszczowego u samic z czynnością jajnika widać wyraźną zależność istniejącą między nimi. U samic, które posiadają w jajniku jaja małe, nie zawierające jeszcze żółtka, ciało tłuszczowe jest ogromne i komórki jego

są duże, naładowane substancjami zapasowymi, zwłaszcza tłuszczem. Natomiast u osobników z dużymi jajami, o wytworzonym już żółtku, widzimy ciało tłuszczowe zredukowane do jednej warstwy komórek prawie płaskich, w których tylko gdzieś niedługo znajdują się krople substancji tłuszczowych, glikogenu, czy substancje białkowe. Można powiedzieć, że jest ono „wyczerpane“, podobnie jak w końcowych okresach przepoczwarzania się.

Widać więc tu wyraźną zależność między stanem jajnika a stanem ciała tłuszczowego. Istnieje między nimi stosunek odwrotnie proporcjonalny: duże ciało tłuszczowe — młode jajniki z małymi jajami nie zawierającymi jeszcze żółtka. Duże jaja wypełnione żółtkiem — ciało tłuszczowe zredukowane.

Z obrazów, otrzymanych metodami histochemicznymi, wynika, że ciało tłuszczowe gromadzi w swych komórkach substancje o charakterze zapasowym.

U samca ciało tłuszczowe nigdy nie dochodzi do takich rozmiarów, jak w samicy przed okresem wzrostu jaj, a pod koniec lata ulega znacznej redukcji. Fakt istnienia ciała tłuszczowego u samców wskazuje na drugą jego czynność, a mianowicie na to, iż substancje w nim zawarte służą jako źródło energii dla czynności życiowych komara. U samic substancje zapasowe, w nim zebrane, mają prawdopodobnie podwójne przeznaczenie: źródło energii dla funkcji życiowych organizmu (oddychanie, loty itp.) oraz materiał dla wytwarzania jaj.

Ciekawe jest, że samice łapane na jesieni, w październiku i listopadzie, posiadały ciało tłuszczowe duże i obficie wypełnione zarówno tłuszczem, jak glikogenem i ziarenkami białkowymi. Wiemy, że samice te zimują. Można by więc sądzić, iż są to materiały zebrane jako źródło energii na czas zimowania. Tymczasem badanie komarów zimowych, z grudnia, stycznia i lutego nie wykazuje wyraźnego zmniejszenia się ciała tłuszczowego i substancji w nim zawartych, a co ciekawsze, to fakt, że komary z marca i początków kwietnia, budzące się ze snu zimowego, lecz łapane jeszcze w piwnicach i stajniach, posiadają również ciało tłuszczowe dobrze zachowane. Substancje w nim zawarte nie zostały więc zużyte podczas snu zimowego.

Z badań nad sposobem życia komarów (Martini, Mayer i Weyer 1932) wiemy, że są to samice zapłodnione, które budzą się na wiosnę i po nakarmieniu się krwią składają jaja. Ciało tłuszczowe posiada więc substancje zapasowe,

służące jako źródło energii dla czynności życiowych komara w pierwszych chwilach po obudzeniu się ze snu zimowego oraz w pewnej mierze także jako materiał dla pierwszej porcji jaj, które zostają złożone wczesną wiosną.

Zestawienie wyników i wnioski

Ze stanu dotychczasowych badań zdaje się wynikać, że metodami histochemicznymi da się wykryć rozmieszczenie pewnych substancji chemicznych podczas cyklu rozwojowego i w różnych okresach życia komara, co rzuca światło na stan jego metabolizmu w danym momencie.

Zwłaszcza ciało tłuszczowe, gromadzące w sobie substancje o charakterze substancji zapasowych, a więc substancje białkowe, tłuszczowe i glikogen, wykazuje duże różnice w różnych okresach życia komara. Jaja zawierają dużo substancji zapasowych, nagromadzonych jako żółtko i nie skombinowane z nim substancje tłuszczowe. Służą one jako źródło materii i energii dla rozwijającej się larwy. Larwa wykluta z jaja żadnej z tych substancji nie posiada.

W miarę odżywiania się zaczyna ona gromadzić wyżej wymienione substancje w ciele tłuszczowym, które się w niej wtedy rozwija.

Larwy w ostatnim stadium posiadają kolosalnie rozwinięte ciało tłuszczowe, zawierające bardzo duże ilości substancji zapasowych. Substancje te zostają w znacznej mierze zużytkowane podczas przepoczwarczania się.

Po wykluciu komar zaczyna się odżywiać, jego ciało tłuszczowe powiększa się i zaczyna gromadzić materiały zapasowe takie same, jak larwa. Zachodzi to zarówno u samca jak samicy, z tą różnicą, że u samca stanowią one źródło energii dla funkcji życiowych, jak oddychanie, loty, produkowanie plemników, u samic, u których osiąga ono ogromne rozmiary, stanowi poza tym rezerwuuar substancji dla tworzenia się żółtka w jajach.

U samca, który ginie na jesieni, ciało tłuszczowe pod koniec lata prawie całkowicie zanika, u samicy, która zimuje i składa jaja na wiosnę, ciało tłuszczowe gromadzi rezerwy na zimę.

Wyrazem zwolnionych funkcji życiowych samicy zimującej jest fakt, że ciało tłuszczowe w miesiącach zimowych ulega redukcji bardzo nieznacznej, a substancje w nim zawarte zostają zachowane jako źródło energii dla procesów życiowych komara po obudzeniu się oraz dla złożenia pierwszej porcji jaj na wiosnę.

Niezwykle ciekawe jest zachowanie się komórek ciała tłuszczowego, które gromadzą w sobie, a następnie oddają organizmowi substancje zapasowe. Należałoby zbadać pochodzenie ich i własności oraz przekonać się, czy nie posiadają cech wspólnych z komórkami histiocytarnymi zwierząt ssących. Wiele zdaje się przemawiać za tym przypuszczeniem. Zbadanie tej kwestii wymaga jednak osobnego studium.

* * *

Praca niniejsza, rozpoczęta w Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie, została dokończona po przeniesieniu się go do Łodzi w 1945 r.

Niech mi wolno będzie w tym miejscu złożyć podziękowanie P. Dyrektorowi Drowi F. Przesmyckiemu za umożliwienie mi wykonania jej oraz P. Drowi Janickiemu, kierownikowi pracowni parazytologicznej, za niezwykle przychylne ustosunkowanie się do niej, odstępowanie cennego materiału i zdobywanie potrzebnych odczynników, a nadewszysto, gotowość służenia w każdej chwili wszelką pomocą i radą.

ETUDES HISTOLOGIQUES ET HISTOPHYSIOLOGIQUES DU MOUSTIQUE ANOPHELES MACULIPENNIS MEIG.

Dans le présent travail on a examiné à l'aide des méthodes histochimiques le comportement des protides, des graisses et du glycogène pendant le développement de même que pendant les différentes périodes de la vie d'*Anopheles* adultes.

Le matériel. Les Moustiques adultes, les larves de tous les stades et les nymphes étaient fixées 2—3 fois dans tous les mois de deux années successives, 1942 et 1943. Ainsi on a recueilli à peu près 300 lots contenant chacun 10 Moustiques provenant d'une capture ou plusieurs larves d'une ponte.

Méthodes. On a employé les méthodes courantes pour la détection des protides, des lipides et du glycogène.

Le développement des oeufs. Pendant le procès de l'oogenèse le noyau prend l'aspect très bizarre. De même que Nicholson (1922) a démontré chez le *Culex*, il se ramifie dans les oeufs d'*Anopheles* et prend la forme d'une cuvette, ce qui donne sur les coupes l'aspect d'un mince fer à cheval ou d'une couronne fortement colorés par l'hématoxyline. Ensuite il se dissipe parmi les plaquettes vitellines en voie de formation. Ces plaquettes montrent le caractère protidique et sont suspendu dans une substance grasseuse. Les plaquettes vitellines ainsi que la substance grasseuse sont ensuite entièrement utilisés pendant le développement de l'oeuf.

Les larves après l'éclosion et même après la première moule ne contiennent dans leur corp aucune des substances sous dites. Ces dernières apparaissent dans le corp adipeux qui se developpe sous forme de deux lobes situés de chaque coté de l'intestin et d'une couche de cellules au dessous du tégument. Il prend des grandes dimensions chez les larves plus âgées (IV stade) et forme des amas de cellules qui pénètrent parmi tous les organes. Ces cellules sont remplies des grains protidiques, des gouttes de graisse neutre ainsi que de glycogène qui s'y trouve en grande quantité. A part du corp adipeux on decèle du glycogène dans les cellules épithéliales de l'intestin et dans les ocelles; les lipides dans le cerveau et dans les ganglions.

Les nymphes. Leur corp adipeux diminue au fur et à mesure que les substances qu'il renferme deviennent utilisées pendant la métamorphose. Il se réduit à une couche mince de cellules presque plates contenant des quantités minimales des substances de réserve.

Les Moustiques adultes. Les substances mentionnées se trouvent surtout dans le corp adipeux. Son état est très différent pendant les diverses périodes de la vie des Anopheles adultes. Il y a une intime relation entre l'état du corp adipeux et l'intensité du métabolisme pendant les diverses saisons. Tout d'abord il se comporte autrement chez les mâles et chez les femelles. Chez les femelles en été, alors qu'elles produisent et pondent des oeufs, son état et la quantité de substances qu'il renferme dépend de l'état de l'ovaire. Si les oeufs sont jeunes et ne contiennent pas encore du vitellus le corp adipeux est grand et rempli de substances de réserve, chez les femelles ayant les oeufs remplis du vitellus le corp adipeux est réduit à une couche des cellules presque plates contenant de minimales quantités de substances de réserve. Chez les mâles le corp adipeux se developpe aussi en été, mais il devient réduit vers la fin de cette saison avant que les mâles disparaissent en automne.

Les femelles hibernent et pondent au printemps. Leur corps adipeux accumule donc des substances de réserve non seulement pour l'hiver, mais aussi pour la production des oeufs pour la première ponte au printemps. Les dimensions du corp adipeux ne changent pas beaucoup pendant l'hiver et même aux mois de mars et d'avril contiennent de quantités considérables des substances de réserve.

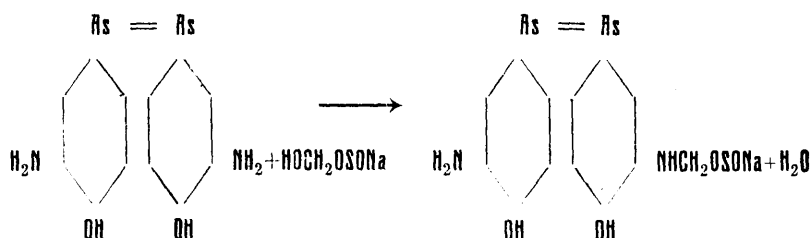
- Białaszewicz K. i Mincówna M. 1921. Wyd. Tow. Nauk. Warsz. T. I.
Brumpt E. 1927. *Precis de parasitologie*. Paris.
Christophers S. R. 1911, *Paludism simla* T. II.
Fauré-Fremiet E. 1913. *Arch. d'Anat. micr.* T. XV.
Filiptschenko. 1907. *Revue russe d'Entomologie* (cyt. wedl. Schrodera).
Konopacki M. 1924. *Compt. Rend. Soc. de Biol. Paris.* XC.
Konopacki M. 1926. *Bull. Ac. Sc. Cracovie*.
Konopacka B. 1933. *Arch. de Biol.* T. XCIV.
Konopacka B. 1935. *Bull. Ac. Sc. Cracovie*.
Konopacka B. 1937. *Pubblic. Staz. Zool. Napoli.* T. XVI.
Koschewnikow S. 1908. *Arch. Zool. Exp.* T. VIII.
Martini E., Mayer F. i Weyer F. 1933. *Rivista di Malariologia* T. IV
Martini E. 1941 *Lehrbuch d. med. Entomologie*.
Nicholson J. A. 1921. *Quart. Journ. Micr. Sc.* T. CXV.
Perez A. 1910. *Arch. Zool. Exp.* T. V ser. II.
Roubaud E. 1932. *Rivista di Malariol.* T. VI.
Schreder Ch. 1929. *Handb. d. Entomologie*.
Vaney et Conte. 1903 i 1909. *C. Ren. Soc. Biol. Paris.* T. XVI i CXV.
Brumpt. E. 1927. *Precis de parasitologie*. Paris.
-

Z Państwowego Zakładu Higieny
Nacz. Dyrektor: Prof. Dr F. Przesmycki

NOWE METODY BADAŃ NEOSALWARSANÓW

Mgr EDWARD MALEC

Neosalwarsan nie jest związkiem chemicznym jednolitym, lecz mieszaniną całego szeregu związków, stanowiącą produkt kondensacji 3,3'-dwuamino-4,4'-dwuoksy-arsenobenzenu (zasada salwarsanowa lub dwuchlorowodorka tego związku (salwarsan) z formaldehydosulfoksylianem sodowym (rongalitem) według schematu:



W zależności od stosunku molowego związków reagujących, ich stężenia, rozpuszczalnika, w którym przeprowadza się kondensację, temperatury itp., proces powyższy może prowadzić do otrzymania produktów, w których głównymi składnikami mogą być jedno¹⁾-, dwu²⁾-, trój³⁾-, a nawet cztero⁴⁾-podstawione pochodne rongalitowe zasady salwarsanowej w sensie powyższego równania.

Neosalwarsany handlowe o przewadze jednopodstawionej pochodnej rongalitowej 3,3'-dwuamino-4,4'-dwuoksy-arsenobenzenu, którą umiawiamy się nazywać neosalwarsanem jednolącuchowym, gdyż posiada on tylko jeden łańcuch rongalitowy przy azocie aminowym, noszą nazwę neosalwarsanów jednolącuchowych, zaś neosalwarsany handlowe o prze-

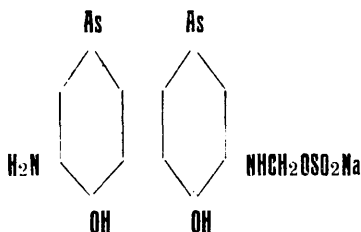
wadze dwupodstawionej pochodnej rongalitowej zasady salwarsanowej, którą umawiamy się nazywać neosalwarsanem dwułańcuchowym, noszą nazwę neosalwarsanów dwułańcuchowych.

W sposób analogiczny należy rozumieć nazwy neosalwarsanów trój- i czterołańcuchowych.

Neosalwarsany handlowe pojmowane w sensie powyższym, a więc jako mieszaniny neosalwarsanów n-łańcuchowych ($n=1, 2, 3, 4$) zawierać mogą poza tym domieszki związków bądź wprowadzonych z reagentami w procesie kondensacji, jako ich zanieczyszczenia, bądź też wytworzonych w wyniku zmian chemicznych gotowego już produktu kondensacji.

Do grupy pierwszej domieszek zaliczyć wypadnie: siarczany, siarczyny, podsiarczyny, wolny rongalit i formaldehydodwusiarczyn, zwane ogólnie związkami neosalwarsanowej siarki ubocznej, dalej chlorek sodowy, salwarsan względnie jego zasada, nieznaczne ilości neosalwarsanów zulfonowanych (w rdzeniu) oraz tlenki fenyloarsinowe; do grupy drugiej zaś — tlenki fenyloarsinowe „zrongalitowane“ przy azocie aminowym, powstałe wskutek utlenienia się neosalwarsanu, sulfosalwarsany, wytworzone przez utlenienie się łańcucha rongalitowego ($-\text{CH}_2\text{OSONa}$) do formaldehydosiarczynowego ($-\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{Na}$) itd.

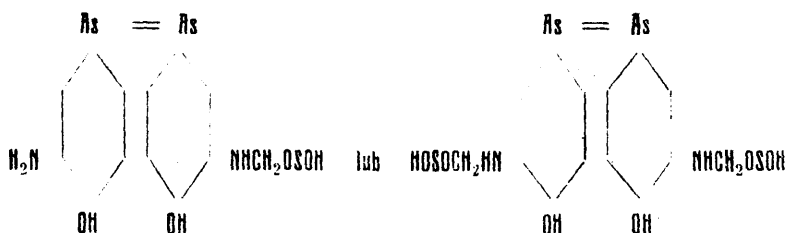
Wymienionemu wyżej sulfosalwarsanowi w postaci jednołańcuchowej należy przypisać wzór następujący:



Dotychczasowe badania handlowych neosalwarsanów względnie sulfosalwarsanów sprowadzały się do oznaczenia procentowej zawartości arsenu, azotu, siarki w związanym z arsenobenzenem rongalicie względnie formaldehydodwusiarczynie czyli t. zw. „siarki łańcuchowej“ (Sl), siarki, związanej z rdzeniem benzenowym, zwanej „siarką rdzeniową“ oraz siarki, nie związanej zupełnie z ugrupowaniem arsenobenzynowym czyli t. zw. „siarki ubocznej“ (Sc), a nad to siarki siarczanej (Sso_4), czasem jonu chlorowego (Cl^+).

Zawartość procentową arsenu oznaczano bądź bromometrycznie metodą Kirchera i Rupperta⁵ lub Schulecka⁶ i Györy⁷ bądź też jednometrycznie metodą Lemana⁸.

Zawartość procentową „siarki rdzeniowej” wyliczano z różnicy zawartości siarki ogólnej (Sa), oznaczonej metodą opisaną u Lungego⁹ i sumy zawartości siarki łańcuchowej i ubocznej (Sb), oznaczanej metodą utleniania siarki jodem do SO_4 /¹⁰. Zawartość procentową „siarki ubocznej” oznaczano metodą kwasową (działanie kwasem solnym¹¹), polegającą na wytrącaniu kwasem solnym kompleksów arsenobenzenowych o charakterze kwasów, znanych krótko „neokwasami” o budowie:



i oznaczaniu zawartości siarki w przesączu po uprzednim jej utlenieniu do SO_4 według metody oznaczania siarki Sb. Wreszcie zawartość procentową „siarki łańcuchowej” (Sl) obliczano z różnicy zawartości siarki Sb i „siarki ubocznej” (Sc).

Siarkę siarczanową oznaczono według metody Elvove'a¹², azot według znanej powszechnie metody Kjedahla, a chlorki według metody, polegającej na usunięciu kompleksu arsenobenzenowego¹³.

Na podstawie wyników analizy powyższej, a głównie oznaczeń zawartości „siarki łańcuchowej” i arsenu wyliczano dopiero, ilo-łańcuchowe neosalwarsany wchodzą w skład neosalwarsanów handlowych.

Stwierdzono w ten sposób, iż polskie neosalwarsany handlowe są z reguły jednolańcuchowe z nieznaczną tylko domieszką neosalwarsanów dwułańcuchowych.

Jednak ten sposób badania nie mógł zadowolnić wymagania ściśle naukowego ze względu na pewnego rodzaju przypadkowość w uzyskiwaniu wyników na zawartość „siarki ubocznej” (Sc), zgodnych ze sobą tylko w równocześnie ścisłych ze sobą warunkach w pełnym tego słowa znaczeniu. Okazało się bowiem, że wyniki oznaczania tego składnika metodą wyżej wymienioną, zależą w dużym stopniu od czasu działania kwasu solnego na neosalwarsan, przy czym znale-

zione zawartości maleją wraz ze wzrostem czasu tego działania. Utrzymanie jednakowych czasokresów oddziaływania kwasu solnego na neosalwarsan w oznaczeniach równoległych „siarki ubocznej“ jest kwestią wyłącznie przypadku, choćby ze względu na szybkość sączenia wytrąconego neokwasu, zależną, jak wiadomo, nie tylko od postaci osadu, ale również od gęstości sączka, jego przylegania do lejka, kształtu tego ostatniego itp., ogólnie mówiąc od wielu okoliczności, które mogą wpływać ujemnie na sączenie, a których jednocześnie nie sposób przewidzieć i wyeliminować.

Ze względów powyższych należało zmodyfikować metodę oznaczania zawartości „siarki ubocznej“ w ten sposób, aby czas zetknięcia się neosalwarsanu z kwasem solnym dla różnych prób można było uznać za jednakowy, a równocześnie wystarczający do zupełnego wytrącenia neokwasu.

W związku z tym inż. Stanisław Jurkowski opracował metodę oznaczania „siarki ubocznej“, pozwalającą w sposób prosty i wygodny uniknąć wszystkich wyżej omówionych trudności.

Metoda ta przedstawia się następująco: 0,5 do 0,6 g neosalwarsanu odważa się do kolby miarowej na 100 cm³, wypełnionej azotem, zalewa około 60 cm³ wody, uwolnionej od tlenu, a po rozpuszczeniu dodaje 5 cm³ 10%-wego kwasu solnego, mieszając. Następnie dodaje się wody, pozbawionej tlenu, do kreski, silnie wstrząsa i zostawia do odstania się osadu, na co wystarcza 20—30 minut. Klarowną ciecz z nad osadu odciąga się pipetą do kolby miarowej na 50 cm³, przepuszczając ją przez suchy sączek, średnio gęsty. Pobrane w ten sposób 50 cm³ przesącza przelewa się ilościowo do zlewki, dodaje roztworu jodu (n/10) aż do powstania zabarwienia brązowego, nakrywa zlewkę szkiełkiem zegarkowym i ogrzewa w ciągu ośmiu godzin (zgodnie z przepisem metody jodowej) ponawiając od czasu do czasu dodatek roztworu jodu. Utlenioną w ten sposób siarkę do jonu SO₄⁻² strąca się następnie roztworem chlorku baru w sposób opisany u Treadwella¹⁴).

Uzyskane metodą St. Jurkowskiego wyniki są zupełnie ze sobą zgodne i wskazują, iż polskie neosalwarsany handlowe są neosalwarsanami jednołańcuchowymi.

Do innych zgoda wniosków, jeśli chodzi o ilości łańcuchów rongalitowych przy grupach aminowych połączeń arsenobenzenowych, dochodzi się w sposób odmienny, mianowicie posługując się zupełnie inną, wynalezioną przez autora pracy niniejszej, metodą fizykochemiczną, opartą na własności wytrącania się kompleksów neosalwarsanowych od dodatku roz-

tworu chlorku chromowego i torowego w postaci bliżej nie zbadanych i nierozpuszczalnych w wodzie osadów.

Okazało się przy tym, że konieczny jest w tych doświadczeniach pewien dodatek koloidów dodatnich, jakimi są wodorotlenki metaliczne.

Autor pracy niniejszej zbadał działanie następujących wodorotlenków metalicznych: chromowego, glinowego, niklawego, magnezowego i torowego. Roztwory koloidalne tych wodorotlenków wytwarzano, peptyzując je za pomocą 5%-owych roztworów chlorku chromowego i chlorku torowego.

a) Badanie z roztworem chromowym

Znany jest fakt, że jeśli dodać do roztworu wodnego chlorku chromowego pewną określoną ilość ługu sodowego, a mianowicie taką, aby chlorek chromowy występował w nadmiarze, wówczas nie wytrąci się wodorotlenek chromowy, gdyż przejdzie on w stan koloidalny.

W pracy niniejszej używano do badań neosalwarsanów roztworu chromowego, powstającego przez zmieszanie 10 cm^3 5%-owego CrCl_3 z 6 cm^3 $n/2\text{ NaOH}$. W tych warunkach wodorotlenek chromowy zostaje całkowicie speptyzowany (zwykle dopiero po upływie paru godzin) i nie wydziela się z roztworu. Oddzielanie powstającego w roztworze chlorku sodu nie jest potrzebne, gdyż jest on zawarty jako domieszka w samym neosalwarsanie.

Jeśli zatem dodać do roztworu wodnego neosalwarsanu pewną ilość sporządzonego w ten sposób roztworu chromowego, to wytrąca się od razu osad barwy jabłkowo-zielonej, który należy odsączyć na zimno w atmosferze azotu. Osad odsącza się po upływie kilkunastu minut, aby mógł się w ciągu tego czasu skoagulować. Koagulację osadu przyspiesza się, dodając kilka cm^3 nasyconego roztworu chlorku sodowego. Po odsączeniu przemywa się osad zimną wodą destylowaną, pozbawioną tlenu, aż do zaniku reakcji na jon chlorowy. W otrzymanym osadzie znajdują się nierozpuszczalne pochodne chromowe ugrupowań arsenobenzenowych, zawierające łańcuchy boczne z siarką, natomiast nie ma w nim wcale związków siarki ubocznej (Sc), na które składa się siarka, zawarta w siarczanie, rongalinie i formaldehydosiarczynie, gdyż sole chromowe tych związków są rozpuszczalne. W ten sposób oddziela się siarkę, związaną w łańcuchach bocznych, którą określa się w osadzie, od siarki ubocznej. Do analizy należy wytworzyć dwa oddzielne osady, z których jeden służy do ozna-

czenia arsenu, a drugi — siarki, związanej w łańcuchach bocznych.

Doświadczenie wykonywa się jak następuje: do dwóch słoików na 100 cm³ z doszlifowanymi korkami odważa się ściśle jednakowe ilości substancji, w przybliżeniu po 0,3 g, dodaje po 50 cm³ wody pozbawionej tlenu, a po rozpuszczeniu się substancji po jednakowej ilości cm³ roztworu chromowego (po 8—10 cm³ do każdego słoika) i po 5 cm³ nasyconego roztworu chlorku sodowego. Po kilkakrotnym wytrząśnięciu zamkniętych i wypełnionych uprzednio azotem słoików odstawia się je na przeciąg kilkunastu minut, po czym sączy. Przesącze chwyta się do flaszek na 250 cm³ z doszlifowanymi korkami, dopełnia wodą beztlenową do szyjek, zamyka, uszczelniając korki za pomocą parafiny i odstawia na pewien czas. Roztwory te, początkowo barwy zielonej, po upływie paru godzin przybierają barwę żółto-zieloną i zaczynają się z nich wydzielać osady żółto-brązowe, których ilość wzrasta z czasem, a całkowite ich wydzielanie się trwa około dziesięciu dni. Po upływie zatem 10 dni odsącza się osady, przemywa zimną wodą destylowaną, pozbawioną tlenu, i oznacza w nich zawartość arsenu i siarki.

Osad zielony, wydzielony od razu po dodaniu roztworu chromowego będą dalej nazywać frakcją pierwszą, zaś osad wydzielony po upływie 10 dni — frakcją drugą. Przesącze, otrzymane po oddzieleniu frakcji drugiej chwyta się do flaszek na 300 cm³, dopełnia wodą beztlenową do szyjek, zamyka i odstawia na pewien czas w celu sprawdzenia, czy proces wytrącania został zakończony. W wypadku zaobserwowania zmętnienia, odsącza się po zupełnym sklarowaniu się roztworu (po paru dniach) i osady dołącza do frakcji drugiej. Osadów nie potrzeba suszyć ani ważyć, gdyż w oznaczeniach ważne są tylko wartości procentowe arsenu i siarki w stosunku do użytej ilości substancji pierwotnej neosalwarsanu.

Zawartość arsenu oznacza się, spalając jeden z osadów w kolbie Kjeldahla z perhydrolem i 10 cm³ H₂SO₄ (c. wł. 1,84), zważając, aby podczas spalania był zawsze obecny nadmiar perhydrołu. Po odpędzeniu nadmiaru wody utlenionej ogrzewa się jeszcze aż do chwili ukazania się dymów kwasu siarkowego, po czym spłukuje roztwór do erlenmeyerki na 300 cm³, a po rozcieńczeniu do 200 cm³ ogrzewa się i strąca arsen za pomocą siarkowodoru. Otrzymany siarczek arsenu przerabia się podług Treadwella¹⁵⁾ lub też spala znowu z H₂O₂ i H₂SO₄ w kolbie Kjeldahla, a po odpędzeniu nadmiaru wody utlenionej rozcieńcza się, dodaje roztworu n/10 KMnO₄

aż do wystąpienia wyraźnego zabarwienia różowego, które z kolei usuwa się, dodając po kropli roztworu $n/10$ $H_2C_2O_4$. Po oziębieniu przelewa się roztwór ilościowo do kolby z doszlifowanym korkiem i dolewa tyle wody, aby ogólna objętość roztworu nie przekraczała 60—70 cm^3 , dodaje 2,5 g KJ, zamyka kolbę, wstrząsa aż do rozpuszczenia się soli, odstawia w ciemne miejsce na przeciąg jednej godziny, po czym dodaje 150 cm^3 wody i miareczkuje wydzielony jod za pomocą $n/10$ lub $n/100$ $Na_2S_2O_3$. Z zużytej ilości cm^3 $Na_2S_2O_3$ wylicza się zawartość arsenu, wyrażając ją w procentach w stosunku do użytej ilości substancji pierwotnej neosalwarsanu.

Zawartość siarki, związanej w łańcuchach bocznych, określa się w sposób następujący: osad wraz z sączkiem wrzuca się do zlewki, zalewa wodą i $n/10$ roztworem jodu, aż do zbrązowienia mieszaniny i ogrzewa w ciągu ośmiu godzin przy czystym dodawaniu roztworu jodu, po czym przesącza, przemylwa wodą i strąca w przesączu w znany sposób jon SO_4^{4-} . Z otrzymanej ilości siarczanu barowego wylicza się zawartość siarki, wyrażając ją w procentach w stosunku do użytej do analizy ilości neosalwarsanu. Z zawartości procentowej arsenu i siarki w obu frakcjach oblicza się ilość wiązań — $As=As$ — oraz ilość gramoatomów S na 100 g neosalwarsanu i ich stosunek molowy — $As=As$ — : S.

Jeśli ten stosunek jest bliski jedności, to związek wytrącony w postaci połączenia chromowego jest jednołańcuchowy, jeśli zaś jest bliski $1/2$, to związek ten jest dwułańcuchowy.

b) Badania z roztworem torowym

Stosowano roztwór, sporządzony przez zmieszanie 10 cm^3 5%-owego $ThCl_4$ z 5 cm^3 $n/2$ NaOH. Wydzielający się początkowo wodorotlenek torowy zostaje po pewnym czasie całkowicie speptyzowany przez nadmiar chlorku torowego.

Otrzymany w ten sposób roztwór torowy wytwarza osad barwy żółtej z roztworem wodnym neosalwarsanu. Do analizy arsenu i siarki należy wytworzyć dwa oddzielne osady, przy czym doświadczenie przeprowadza się w sposób następujący: do słoików na 100 cm^3 , wypełnionych azotem, odważa się po 0,3 g neosalwarsanu, dodaje po 5 cm^3 wody destylowanej, pozbawionej tlenu, oraz po jednym cm^3 40%-owej formaliny zobojętnionej ługiem sodowym, w celu przeprowadzenia ewentualnie zawartego w neosalwarsanie handlowym siarczynu sodowego w formaldehydosiarczyn sodowy, nie dający osadu

z ThCl_4 (siarczyn sodowy wytwarza trudno rozpuszczalny Th_2SO_4), po czym słoiki zamyka się korkami. Po upływie 10 minut dodaje się po 60 cm^3 wody destylowanej, pozbawionej tlenu, a następnie po 14 cm^3 roztworu torowego, wreszcie do słoika, zawierającego osad przeznaczony do określenia arsenu, dodaje się 5 cm^3 nasyconego roztworu NaCl . Po upływie około 15 minut odsąca się oba osady, pracując stale w atmosferze azotu.

Zawartość arsenu oznacza się, spalając osad wraz z sączkiem w kolbie Kjeldahla z H_2SO_4 i H_2O_2 . Podczas stężania roztworu należy stale poruszać kolbą, aby uniknąć przegrzewania się cieczy skutkiem wydzielającego się osadu siarczanu torowego. Skoro ukażą się dymy kwasu siarkowego, oziębia się nieco kolbę, rozcieńcza wodą i dodaje roztworu $\text{n}/10\text{ KMnO}_4$ aż do wyraźnego różowego zabarwienia, które z kolei usuwa się, dodając po kropli roztworu $\text{n}/10\text{ H}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

Po oziębieniu przelewa się ciecz wraz z osadem ilościowo do kolby stożkowej z doszlifowanym korkiem, rozcieńcza wodą do $60\text{--}70\text{ cm}^3$, wsypuje $2,5\text{ g KJ}$ i odstawia w ciemne miejsce na przeciąg jednej godziny. Po upływie tego czasu miareczkuje się wydzielony jod za pomocą mianowanego roztworu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, dodawszy uprzednio do kolby 150 cm^3 wody destylowanej.

Zawartość siarki, związanej w łańcuchach bocznych, określa się, wrzucając sączek z drugim osadem do zlewki i ogrzewając z roztworem jodu w ciągu ośmiu godzin, przesączając roztwór i strącając zeń jon SO^{4-}_4 . Otrzymany siarczan baru należy stopić z sodą i strącić SO^{4-}_4 powtórnie w celu usunięcia zaokludowanych soli torowych.

Należy tu zaznaczyć, że w razie obecności znaczniejszych zawartości wolnego rongalitu w handlowym neosalwarsanie może się wytrącić częściowo sól torowa rongalitu, wskutek czego wynik otrzymany na zawartość „siarki łańcuchowej” (Sl) byłby za duży. Decydują jednak zawsze wyniki, otrzymane metodą chromową, gdyż roztwór chromowy nie wytrąca wcale składników siarki ubocznej.

Badania rozpoczęto od sulfosalwarsanu, zwanego przez produkującą go firmę „Ludwik Spiess i Syn, S. A.”, Sulfarsolanem. Jest to sól sodowa kwasu 3,3'-dwuamino-4,4'-dwuoksy-arseno-benzeno-N-metyleno-siarkawego.

Seria 115 Sulfarsolanu

Do wytrącenia osadów używano początkowo mniej odczynnika chromowego, niż to wynika z opisu ogólnego, mia-

nowicie po 3 cm³ (ilość odczynnika wpływa na ilość obu frakcyj).

Znaleziono we frakcji pierwszej 3,692% As i 1,60% S licząc na neosalwarsan użyty do badania, co daje 0,02464 wiązań — As=As — i 0,04991 gramoatomów S w przeliczeniu na 100 g neosalwarsanu. Stosunek molowy — As=As — S=0,4938 jest bliski 1/2, co wskazuje nas to, iż frakcja ta jest pochodną chromową sulfosalwarsanu dwułańcuchowego jaki wchodzi w skład preparatu handlowego.

We frakcji drugiej znaleziono 14,95% As i 3,19% S w powyższym rozumieniu, co daje 0,09980 wiązań — As=As — i 0,09948 gramoatomów S oraz stosunek molowy — As=As — S=1,003; zatem frakcja druga jest pochodną chromową sulfosalwarsanu jednołańcuchowego.

Zjawiska wytrącania się osadów chromowych wydają się bardzo skomplikowane, jeśli zważymy, że według Kolthoffa i Pauli'ego koloid jest złożonym związkiem chemicznym, odczepiającym częściowo jony i ładującym się, jak elektrolity.

Według tego poglądu koloidalny wodzian chromowy byłby zasadowym chlorkiem, wysyłającym część chloru jako jon Cl⁻, resztę zaś zatrzymującym wewnątrz ziarna:



Jest zatem rzeczą bardzo możliwą, że takie właśnie złożone ugrupowania reagują z roztworami neosalwarsanów, tworząc skomplikowane połączenia arsenobenzenowe wskutek związania się atomów sodu łańcuchów rongalitowych z atomami chloru wymienionych ugrupowań koloidalnych.

Dalsze badania wykażą, że frakcja druga powstaje wskutek samorzutnego rozpadu związków dwułańcuchowych, które, tracąc połowę całej ilości siarki, zawartej w łańcuchach bocznych, przechodzą w związek jednołańcuchowy. Mielibyśmy więc tu do czynienia z odbudową pochodnych chromowych dwułańcuchowych do pochodnej chromowej, zawierającej tylko połowę pierwotnej ilości siarki, związanej w łańcuchach bocznych. Okaze się nad to, że również i frakcja pierwsza, a więc związek dwułańcuchowy, który wytrąca się od razu w postaci osadu zielonego, jest także nietrwała i, odczepiając łańcuch boczny, przekształca się w związek, odpowiadający połączeniu jednołańcuchowemu.

Dowiedziano tego w sposób następujący: wytrącono frakcję pierwszą jak poprzednio, wychodząc z tej samej ilości substancji i dodając tę samą ilość odczynnika strącającego

a po przemyciu osadu wodą, pozbawioną tlenu, umieszczono sącdek wraz z osadem w słoiku z doszlifowanym korkiem na 100 cm³, dodano następnie wody beztlenowej aż do szyski, zamknięto, uszczelniono korek parafiną i odstawiono na przeciąg 10 dni. Po upływie tego czasu oznaczono zawartość siarki w osadzie i w przesączu. Znalezione w osadzie, który zawierał początkowo 1,60% S, tylko połowę tej zawartości, t. j. 0,80% S, zaś w przesączu 0,79% S, a więc resztę. Ponieważ frakcja ta stanowiła, jak to wykazano już poprzednio, neosalwarsan dwułańcuchowy, przeto odcięcie się połowy siarki wskazuje na odcięcie się jednego łańcucha bocznego, czyli na przechodzenie sulfosalwarsanu dwułańcuchowego w jednołańcuchowy wyłącznie pod wpływem wody.

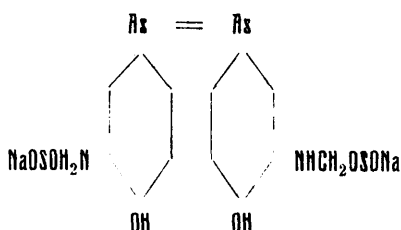
W osobnym doświadczeniu, wykonanym w sposób identyczny, oznaczono zawartość arsenu w osadzie rozłożonym, znajdując 3,66% As, a więc ilość użytą do badania.

Następnie wytworzono dwa osady torowe, przeznaczając jeden z nich do oznaczenia arsenu, drugi zaś do oznaczenia siarki. W tym celu odważono po 0,3 g substancji do dwóch słoików, zawierających po 5 cm³ wody i po 1 cm³ 40%-owego roztworu formaliny, po upływie 10 minut dodano po 60 cm³ wody i po 14 cm³ roztworu torowego. Wydzielone osady odsączono i zanalizowano, znajdując 19,71% As i 8,34% S w stosunku do substancji wyjściowej, co odpowiada 0,1316 wiązań — As=As — i 0,2602 gramatomów S na 100 g substancji wyjściowej. Stosunek molowy — As=As — : S=0,5057 jest bliski $\frac{1}{2}$, co wskazuje, że wytrącił się związek dwułańcuchowy.

Ponieważ ogólna ilość arsenu w Sulforsolanie serii 115 wynosi 19,86%, zaś w związku torowym znaleziono 19,71%, roztwór torowy zatem wytrąca praktycznie biorąc, wszystkie związki arsenobenzenowe. Wraz z nimi wytrąca się związana w łańcuchach bocznych „siarka łańcuchowa“ (S1); ponieważ zaś znaleziono, że suma siarki ubocznej i łańcuchowej (Sb) wynosi 11,58%, zatem siarki ubocznej (Sc) byłoby Sb—S1 czyli dla danej serii 11,58—8,34=3,24% w stosunku do użytej ilości Sulfarsolanu.

Badania powyższe prowadzą zatem do wniosku, że seria 115 Sulfarsolanu składa się głównie ze związków dwułańcuchowych. Ze względu na to, że ich pochodne chromowe są nietrwałe i względnie łatwo odbudowują się do związków jednołańcuchowych, skłonny jestem przypuszczać, że Sulfar-

solan ma budowę niesymetryczną, albowiem związki o wzorze symetrycznym.

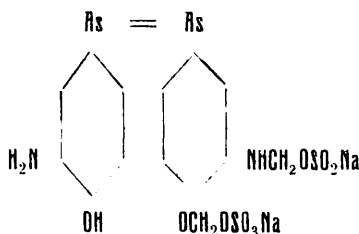


jak później wykazemy, są bardziej trwałe.

W celu ustalenia właściwego wzoru Sulfarsolanu zastosowałem również do badań metodę Elvove'a¹⁶⁾, umożliwiającą oznaczenie różnych rodzajów siarki, które występują w handlowych produktach neosalwarsanów. Metoda ta opiera się na fakcie, że wolny i związany formaldehydosulfoksylan sodowy różnią się w zachowaniu w stosunku do jodu w roztworze obojętnym, przy czym w wypadku tym tylko wolny formaldehydosulfoksylan redukuje jod, natomiast w roztworze alkalicznym jod jest redukowany przez oba te związki: jeśli mianowicie utlenić neosalwarsan nadmiarem roztworu jodu, nadmiar tego ostatniego zredukować arseninem sodowym, roztwór zakwaszyć i strącić siarczany chlorkiem baru, to otrzymuje się wyniki na ogół niższe, niż metodą utleniania jodem¹⁰⁾, zgodnie z wynikami badań E. Jurista i W. G. Christiansena¹⁷⁾.

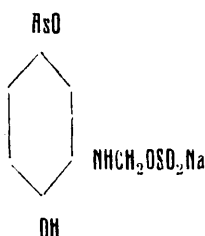
Dla serii 115 Sulfarsolanu zawartość siarki Sb (sumą siarki łańcuchowej i siarki ubocznej), oznaczonej metodą Elvove'a wynosi 5,59%, a więc jest ona aż o 48,27% (czyli prawie o połowę) niższa od wartości, znalezionej metodą utleniania jodem (Sb=11,58%). Wynika stąd zatem, że w przypadku omawianej serii Sulfarsolanu nie utlenia się prawie połowa siarki Sb metodą Elvove'a — pozostaje to również w zgodzie z badaniami W. J. C. Dycke'a i H. Kinga¹⁸⁾ i prowadzi do wniosku, że w handlowym sulfosalwarsanie grupy — $\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{Na}$, utleniające się do kwasu siarkowego w metodzie Elvove'a związane są z grupą aminową, zaś nieutleniające się — z grupami OH.

Sulfosalwarsan (Sulfarsolan) jest zatem solą sodową kwasu 3,3'-dwaamino-4,4'-dwooksy arseno-benzeno-O,N-dwumetyleno-siarkawego i posiada wzór następujący:



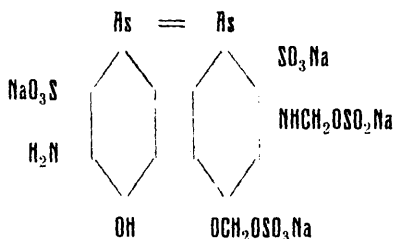
Porównyując dane, otrzymane metodą chromową i metodą torową, stwierdzamy, że roztwór chromowy działa bardziej selektywnie, pozwalając oddzielać związki dwu- od jednołańcuchowych. Roztwór torowy zaś, wydzielając od razu wszystkich arsen organiczny, a tym samym przynależną doń „siarkę łańcuchową“, posiada tę wyższość nad roztworem chromowym, iż pozwala oznaczać „siarkę uboczną“ bez uciekania się do skomplikowanych obliczeń.

Roztwór chromowy strąca w sumie 18,64% As i 4,79% S. Ilość arsenu nie strącającego się od roztworu chromowego i wynosząca $19,71 - 18,64 = 1,07\%$ jest związana w jakichś innych połączeniach arsenobenzenowych, np. w tlenkach fenoloarsinowych, połączonych z łańcuchem rongalitowym:



Przyjmując wyniki metody torowej dochodzimy do wniosku, że seria 115 Sulfarsolanu zawiera 8,34% S w związkach dwułańcuchowych oraz 3,24% siarki ubocznej. Należy jeszcze nadmienić, że Sulfarsolan posiada również pewną ilość siarki, związanej wprost z rdzeniem arsenobenzenowym. Ana-

liza tej serii wykazuje 0,48% „siarki rdzeniowej“, wobec czego możliwy jest nadto związek następujący:

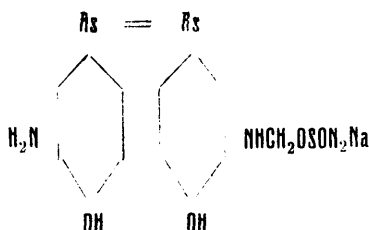


Wyniki badań, otrzymane metodą torową i chromową, zdają się potwierdzać słuszność poprzedniego założenia, że spośród pochodnych arsenobenzenowych związki metali ciężkich są nietrwałe i przekształcają się samorzutnie w związki jednołańcuchowe, co wynikałoby z następujących rozważań: druga frakcja serii 115 odpowiada związkowi jednołańcuchowemu i zawiera 14,95% As oraz 3,19% S. Jeśli uważać, że związek ten powstał z odbudowy związku dwułańcuchowego, to ten ostatni zawierał pierwotnie 6,38% S. Ponieważ jednak w pierwszej frakcji strąca się związek dwułańcuchowy, zawierający 3,69% As i 1,60% S, więc razem związki chromowe dwułańcuchowe zawierają 18,64% As oraz 7,98% S. Po dodaniu do tych liczb wartości 1,07% As i 0,46% S (z wyliczenia: $1,07:74,91 = X:32,06$, skąd $X = 0,46\%$ S), należące do tlenków fenylarsinowych, połączonych z łańcuchem rongalitowym, otrzymamy, że wszystkie związki chromowe arsenobenzenowe zawierają w sumie 19,71% As i 8,44% S, co pozostaje w zupełnej zgodzie z wynikami na zawartość arsenu i siarki według metody torowej (19,71% As i 8,34% S).

Jak już zaznaczono na wstępie, podczas strącania połączeń chromowych neosalwarsanów w stanie niezmienionym konieczna jest obecność koloidalnych wodorotlenków metalicznych. Dla porównania wykonano doświadczenie z chlorkiem chromowym bez dodatku NaOH, a więc nie zawierającym koloidalnego wodorotlenku chromowego.

Po dodaniu 3 cm³ 5%-owego roztworu chlorku chromowego do rozpuszczonej w 50 cm³ wody substancji, roztwory były zupełnie klarowne i dopiero po upływie paru godzin zaczęły mętnieć, wydzielając powoli osad o barwie żółtej, który zawierał 17,10% As i 3,69% S, co daje 0,1141 wiązań — As=As — i 0,1151 gramoatomów S oraz stosunek molowy — As=As — : S=0,9918, a więc bardzo bliski

jedności, co wskazuje, że osad, wydzielony za pomocą CrCl_3 , jest pochodną chromową Sulfarsolanu jednołańcuchowego:



Wynikałoby stąd, że wytrącony osad stanowi produkt odbudowy związków chromowych dwulańcuchowych, podobnie jak i osad, wytrącony za pomocą kwasu solnego z innych odmian neosalwarsanów, jak to się okaże z dalszych badań. (Być może, że odbudowę powoduje w tym przypadku kwas solny, powstający podczas hydrolizy CrCl_3).

Zatem związków dwulańcuchowych nie udaje się wydzielić z roztworu Sulfarsolanu za pomocą chlorku chromowego, nie zawierającego koloidalnego wodorotlenku chromowego.

W pewnych wypadkach odbywają się również rozkłady pochodnych chromowych arsenobenzenowych w czasie bardzo krótkim nawet w obecności koloidalnego wodorotlenku chromowego — przypadek ten zachodzi mianowicie podczas zagotowania roztworu, zawierającego wytrącone frakcje chromowe czy torowe.

Okazuje się z dalszych badań, że rozmaite wodorotlenki koloidalne posiadają różną zdolność wytrącania kompleksów arsenobenzenowych z roztworu Sulfarsolanu. Aby to wykazać, wykonano następujące doświadczenia: po 1/400 mola AlCl_3 , NiCl_2 , MgCl_2 i CrCl_3 przekształcono na wodorotlenki odpowiednich metali, które po odsączeniu i przemyciu wodą spętyzowano za pomocą 15,84 gramów 5%-owego CrCl_3 , czyli 1/200 mola CrCl_3 .

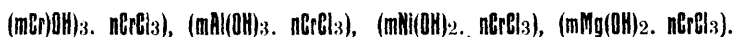
Otrzymane w ten sposób roztwory posłużyły do analizy 116 serii Sulfarsolanu, którą wykonano, dodając do dwóch słoików, zawierających po 0,3 g substancji rozpuszczonej w wodzie, po połowie przyrządzonego odczynnika. W odsączonych osadach oznaczono arsen i siarkę, skąd obliczono stosunek molowy — $\text{As}=\text{As}$ — : S.

Otrzymane wyniki zebrano w tabeli następującej:

R o z t w ó r	%As	%S	$\frac{-As}{S} = \frac{As}{-S}$
chromowo - glinowy	13.37	5.77	0.496
chromowo - niklowy	16.49	7.00	0.504
chromowo - chromowy	13.15	5.72	0.492
chromowo - magnezowy	8.51	3.62	0.503

Dla porównania wykonano również oznaczenia arsenu i siarki z roztworem chromowym i torowym. Roztwór chromowy daje 13,17% As i 5,74% S (stosunek molowy bliski $1/2$), torowy — 19,12% As i 8,19% S (stosunek molowy $1/2$). Ponieważ ogólna zawartość arsenu wynosi 19,28%, więc związki arsenobenzenowe wytrąciły się całkowicie w postaci pochodnych torowych. (Roztworu chromowego dodano tym razem nie 3 cm³, lecz ilość normalną, t. j. 10 cm³ — widzimy więc, że w tym wypadku wytrąciła się przeważająca ilość związanego arsenu, bo aż 13,17% w przeciwieństwie do badania poprzedniego (seria 115), gdzie po dodaniu 3 cm³ roztworu chromowego wytrąciło się od razu tylko 3,692% As).

Z zestawienia, podanego w załączonej tabeli wynika, że koloidalny Ni(OH)₂ strąca największą ilość ugrupowań arsenobenzenowych, zaś koloidalny Mg(OH)₂ — najmniejszą, podczas gdy Al(OH)₃ i Cr(OH)₃ strącają ilości prawie jednokowe. Należy przypuścić, że w tym wypadku roztwory wodne Sulfarsolanu reagują ze złożonymi ugrupowaniami koloidalnymi, które można przedstawić w formie następującej:



Seria 130 Novarsolenu

(z firmy „Ludwik Spiess i Syn, S. A.”)

Jest to sól sodowa kwasu 3,3'-dwuamino-4,4'-dwuoksyarsenobenzeno-N-metyleno-sulfoksylogowego.

a) Badania z zastosowaniem roztworu torowego

W osadzie torowym znaleziono 14,01% As i 6,02% S w stosunku do substancji wyjściowej, czyli 0,0935 wiązań —

As=As — i 0,1877 gramoatomów S (licząc na 100 g neosalwarsanu). Stosunek molowy — As=As — : S=0,498 jest bardzo bliski $\frac{1}{2}$, co dowodzi, że w skład wytrąconego osadu wchodzi pochodne dwułańcuchowe. Ponieważ ogólna ilość arsenu w substancji pierwotnej wynosi 17,08%, więc 3,07% As organicznie związanego nie ulega wytrąceniu. Wnosimy stąd, że arsen nie strącalny w tej metodzie należy do neosalwarsanu jednołańcuchowego, który nie tworzy osadu z roztworem torowym. Ilość siarki łańcuchowej (S₁) w neosalwarsanie jednołańcuchowym wyniosłaby 0,66% w stosunku do substancji użytej do badania.

b) Badanie z zastosowaniem roztworu chromowego.

W osadzie, stanowiącym frakcję pierwszą, znaleziono 12,54% As i 4,73% S, w stosunku do substancji wyjściowej, czyli 0,0837 wiązań — As=As — i 0,1476 gramoatomów S (w przeliczeniu na 100 g neosalwarsanu). Stosunek molowy — As=As — : S=0,5673 jest zbliżony do $\frac{1}{2}$, lecz nieco większy od tej wartości, skąd wnosimy że frakcja ta składa się przeważnie ze związków dwułańcuchowych, jednak zawiera także nieznaczną ilość związków jednołańcuchowych.

Jeśli przez As₁ oznaczymy zawartość procentową arsenu, a przez S₁ zawartość procentową siarki w związkach jednołańcuchowych, wchodzących w skład frakcji pierwszej, zaś przez As₁₂=12,54—As₁ oraz S₁₂=4,73—S₁ zawartości procentowe arsenu i siarki w związkach dwułańcuchowych tejże frakcji, to możemy napisać:

$$\frac{As_1}{149,82} = \frac{S_1}{32,06}; \quad \frac{12,54 - As_1}{149,82} = \frac{4,73 - S_1}{64,12}$$

Rozwiązując te równania względem As₁ i S₁, otrzymamy dla związku jednołańcuchowego:

$$S_1 = 12,54 \cdot \frac{64,12}{149,82} - 4,73 = 0,64\%$$

$$As_1 = \frac{149,82}{32,06} \cdot 0,64 = 2,99\%$$

$$\text{oraz } As_{12} = 9,55\%$$

$$S_{12} = 4,09\% \text{ dla związku dwułańcuchowego.}$$

Rozumowanie powyższe jest słuszne, oczywiście w założeniu, że Novarsolen nie zawiera związków arsenobenzenowych trój- i czterułańcuchowych.

Przesącze otrzymane po oddzieleniu frakcji pierwszej, chwytało do flaszek z doszlifowanymi korkami, dopełniano wodą do szyjek, zamykano i parafinowano. Po pewnym

czasie roztwory te zaczęły mętnieć od wydzielających się stopniowo osadów żółto-brązowych.

Po upływie 10 dni odsączono osady stanowiące frakcję drugą, i oznaczono w nich arsen i siarkę, znajdując 4,40% As i 0,90% S, co daje 0,0294 wiązań — As=As — i 0,0293 gramatomów S (w przeliczeniu na 100 g substancji wyjściowej) oraz stosunek molowy — As=As — : S=1,002, co dowodzi, że frakcja druga jest pochodną chromową neo-kwasu jednołańcuchowego.

Przypuszczamy, że związek ten, podobnie jak i frakcja druga chromowa Sulfarsolanu, powstał z odbudowy związków dwulańcuchowych, które zawierały przed rozkładem $As_2'' = 4,40\%$ oraz $S_2'' = 0,94 \times 2 = 1,88\%$. Wobec tego zawartość siarki we wszystkich związkach dwulańcuchowych wynosiłaby $S_2 = S_2 + S_2'' = 1,09 + 1,88 = 5,97\%$, zaś zawartość siarki związanej w łańcuchach, bocznych, $Sl = S_1 + S_2 = 6,61\%$, przy czym odpowiadałoby jej 12,54 — $As_2'' = 16,94\%$ As.

Ponieważ ogólna ilość arsenu w substancji pierwotnej (Novarsolenie) wynosi 17,08%, wnosimy, że związki arsenobenzenowe zostały wytrącone prawie całkowicie w postaci połączeń chromowych.

Ze znalezionej w osobnym doświadczeniu siarki $Sb = 8,76\%$ znajdujemy zawartość siarki ubocznej $Sc = Sb - Sl = 8,76 - 6,61 = 2,15\%$.

Metoda torowa daje $Sl = S_1 + S_2 = 6,02 + 0,66 = 6,68\%$, skąd $Sc = 8,76 - 6,68 = 2,08\%$.

Wspomniano już wyżej, że prawdopodobnie frakcja druga powstaje wskutek samorzutnego rozpadu związków dwulańcuchowych. Okazuje się, że i frakcja pierwsza, która, jak wykazano, składa się głównie ze związków chromowych dwulańcuchowych, traci z czasem część zawartej w nich siarki. Stwierdzono to w sposób następujący: wytworzono frakcję pierwszą z tejże serii Novarsolenu, wychodząc przy tym z tej samej co poprzednio, ilości substancji i dodając tę samą ilość roztworu chromowego. Po odsączeniu i przemyciu włożono sączek wraz z osadem do słoika z doszlifowanym korkiem na 100 cm³, dopełniono wodą beztlenową do szyjki, zamknięto, uszczelniono parafiną i odstawiono na 10 dni, po czym przesączono i przemyto osad wodą. Przesącz utleniono za pomocą roztworu jodu w ciągu ośmiu godzin i strącono SO_4^{--} . Znalezione 0,89% siarki (Sp). Osad rozpuszczono w ługu sodowym, dopełniono w kolbce miarowej na 100 cm³ wodą do kreski, i po wymieszaniu roztworu podzielono go na dwie

równe części, w których określono zawartość arsenu i siarki. Arsen określono, wlewając roztwór po trochu do kolby Kjeldahla, zawierającej mieszaninę kwasu siarkowego (1,84) i perhydrolu i odparowując za każdym razem do pierwotnej objętości. Po spaleniu i odpędzeniu nadmiaru wody utlenionej strącono siarczek arsenu i przerobiono go w znany sposób, oznaczając arsen jodometrycznie.

Zawartość siarki, związanej w łańcuchach bocznych, oznaczono jak poprzednio, przez ogrzewanie roztworu z jodem, po uprzednim zobojętnieniu go kwasem solnym, i strąceniu SO_4^{4-} . W ten sposób znaleziono: 12,52% As, czyli 0,0836 wiązań — $\text{As}=\text{As}$ — oraz 3,82% S, czyli 0,1192 gramatomów S oraz stosunek molowy — $\text{As}=\text{As}$ — : $\text{S}=0,7013$.

Ponieważ osad, stanowiący frakcję pierwszą, zawierał zaraz po wytrąceniu 12,52% As oraz $3,82 + 0,89 = 4,71\%$ S, przeto początkowo na związek jednołańcuchowy, zawarty w nim, przypadło

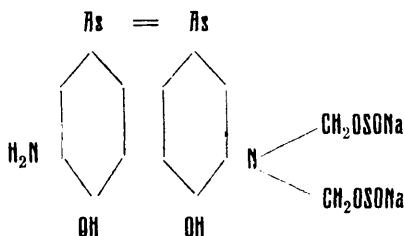
$$S_1 = 12,52 \cdot \frac{64,12}{149,82} - 4,71 = 0,65\%, \text{ zaś po upły-}$$

$$\text{wie 10 dni } S_1 = 12,52 \cdot \frac{64,12}{149,82} - 3,82 = 1,54\% \text{ siarki.}$$

Oczywiście, ta nadwyżka siarki jednołańcuchowej, wynosząca $1,54 - 0,65 = 0,89\%$, powstała wskutek samorzutnego rozpadu pewnej części związków dwułańcuchowych, które zawierać miały $0,89 \times 2 = 1,78\%$ S (2Sp). Ponieważ jednak stosunek molowy dla osadu odsączonego po upływie 10 dni, nie jest bliski jedności (wynosi on 0,7013), wnosimy, że zawiera on jeszcze jakieś związki dwułańcuchowe, które nie ulegają samorzutnemu rozkładowi; przypada na nie $3,82 - 1,54 = 2,28\%$ S.

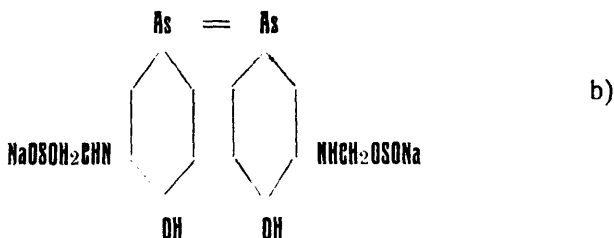
Dochodzimy więc do wniosku, że seria 130 Novarsolenu zawiera, prócz związku jednołańcuchowego, dwa rodzaje związków dwułańcuchowych: związki, które ulegają samorzutnemu rozkładowi do związków jednołańcuchowych, oraz związki, które nie ulegają temu rozkładowi.

Ponieważ związek o budowie



a)

wyduje się być mniej trwałym od związku typu

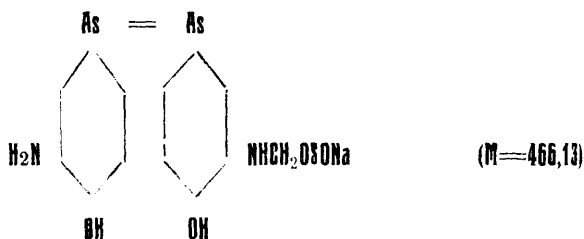


przypuszczamy więc, że związki dwułańcuchowe, ulegające odbudowie do jednołańcuchowych, mają budowę niesymetryczną (a) zaś trwałe — symetryczną (b). Można to uzasadnić również teoretycznie, opierając się na budowie cząsteczki symetrycznej i niesymetrycznej: pierwsza, posiadająca po jednym tylko łańcuchu rongalitowym przy każdym azocie aminowym zdolna jest utrzymać oba te łańcuchy jednocześnie gdy lekkie atomy sodu zostaną zastąpione przez ciężkie ugrupowania koloidu chromowego względnie torowego, druga natomiast, u której jeden z azotów aminowych obarczony jest aż dwoma łańcuchami rongalitowymi, nie może być trwała w postaci pochodnych chromowej i torowej, i zmuszona jest do odcepienia jednego z tych łańcuchów.

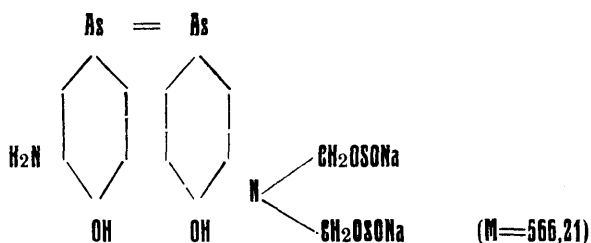
W myśl powyższego i frakcja druga stanowi produkt rozkładu związku dwułańcuchowego niesymetrycznego, zawierającego 1,88% siarki (S''_2). Razem więc związki dwułańcuchowe niesymetryczne zawierają $2\text{Sp} + \text{S}_2'' = 1,78 + 1,88 = 3,66\%$ siarki (Sn). Dla związków dwułańcuchowych symetrycznych obliczyliśmy wyżej 2,28% siarki (Ss).

Badania odbudowy związków dwułańcuchowych powtórzono, odsączając osad nie po 10 dniach, lecz po dwóch miesiącach, otrzymując identyczne wyniki, co potwierdza słuszność powyższego rozumowania.

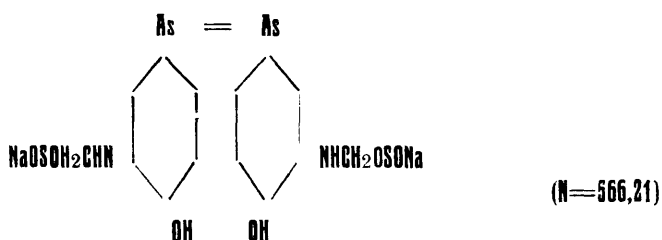
Zestawiając wyniki badania, stwierdzamy, że Novarsolen serii 130-ej stanowi mieszaninę związków arsenobenzenowych i zawiera 9,45% związku jednołańcuchowego o wzorze:



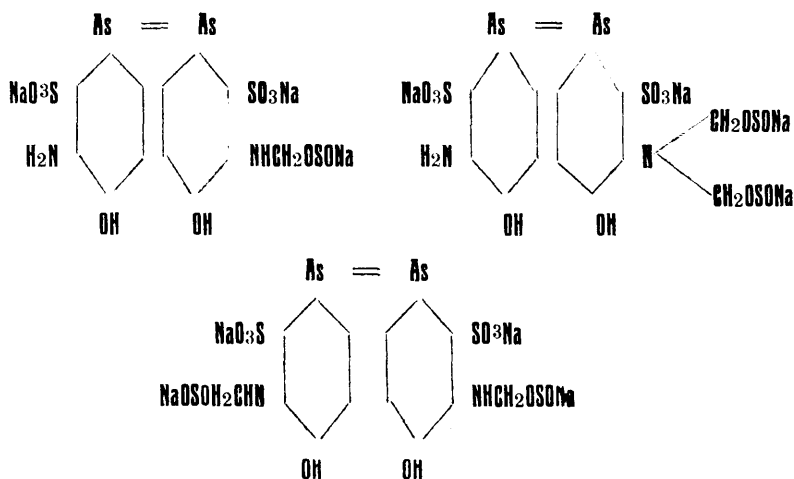
32,32% związku dwułańcuchowego niesymetrycznego o wzorze:



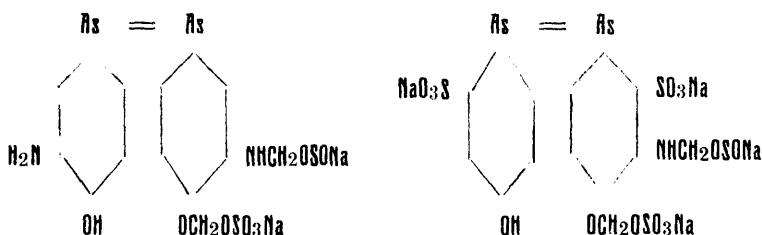
oraz 20,13% związku dwułańcuchowego symetrycznego o wzorze:



Ponieważ analiza wykazuje 0,5% siarki „rdzeniowej“, to znaczy siarki, związanej wprost z rdzeniem benzenowym w grupach — SO_3Na , przeto nieznaczna ilość wyżej przytoczonych związków jest zsulfonywana, wobec czego występować mogą połączenia o wzorach:



Należy również uwzględnić badania, wykonane metodą Elvove'a. Analizując różne odmiany neosalwarsanów, produkowanych przez firmy polskie, stwierdziłem, że wyniki na zawartość siarki Sb są o 1—5,5% niższe od wyników, otrzymanych metodą utleniania jodem. Wynika stąd zatem, że wspomniane odmiany neosalwarsanów zawierają również siarkę nie utleniającą się w metodzie Elvove'a, a więc związaną z grupami — OH. Mielibyśmy tu zatem do czynienia również ze związkami niesymetrycznymi typu:



Wyniki badań, dotyczące serii 133, 134 i 135 Novarsolenu oraz innych odmian neosalwarsanów, jak Neosalutanu (z firmy „Hydrox“) oraz Spironovanu (z firmy „B. Krogulecki“) podano w poniższej tabeli, oznaczając, jak poprzednio, przez S_1 — zawartość procentową siarki w związkach jednołańcuchowych, przez S_2 — w związkach dwulańcuchowych, przez S_n — w związkach dwulańcuchowych niesymetrycznych, przez S_s — w związkach dwulańcuchowych symetrycznych, wreszcie przez S_c — ilość siarki ubocznej, wszystkie w stosunku do substancji wyjściowej, t. j. neosalwarsanu handlowego.

Na serii 32 Neosalutanu wykonano kilka doświadczeń, stosując rozmaite koloidy dodatnie, jak to uczyniono już poprzednio przy badaniu serii 116 Sulfarsolanu. Wytworzono mianowicie po 1/400 mola koloidalnych wodorotlenków $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ni}(\text{OH})_2$, $\text{Cr}(\text{OH})_3$ i $\text{Mg}(\text{OH})_2$ przez peptyzację ich osadów za pomocą 1/200 mola CrCl_3 .

Każde z poszczególnych doświadczeń wykonano, odważając do dwóch słoików po 0,3 g substancji i dodając do każdego słoika, po uprzednim rozpuszczeniu substancji w wodzie, połowę odnośnego roztworu.

W odsączonych osadach oznaczono arsen i siarkę, skąd obliczono wartości procentowe S_1 , S_2 i S_c .

	Metoda chromowa							Metoda torowa			
	Seria	S ₁	S ₂	S _n	S _s	S _c	— $\frac{A_s}{S}$ —				
							S _c	S ₂	S ₁		
Novarsolen	133	0,80	6,33	2,38	3,95	2,04	0,5618	0,4824	2,00	6,20	0,97
	134	0,87	6,49	2,34	4,15	2,25	0,5727	0,5014	2,16	6,70	0,75
	115	0,69	6,47	2,38	4,09	1,82	0,5720	0,5020	1,59	6,75	0,64
Neosalutan	9	0,80	5,72	2,94	2,78	2,64	0,5716	0,5620	2,63	5,72	0,81
	11	1,45	5,66	3,40	2,25	1,76	0,6024	0,6114	1,73	5,72	1,42
Spironovan	5	0,66	7,30	3,67	3,63	1,60	0,5461	0,5475	1,60	7,34	0,64

Otrzymane w ten sposób wyniki podano w następującej tabeli:

R o z t w ó r	As	S	S ₁	S ₂	S _c	— As = As —
						S
Chromowo-glinowy	13,89	4,95	0,97	4,66	4,00	0,6001
Chromowo-niklowy	14,10	5,07	0,96	4,75	3,92	0,5947
Chromowo-chromowy	14,30	5,13	0,99	4,74	3,90	0,5961
Chromowo-magnezowy	13,92	5,04	0,93	4,78	3,92	0,5918

Z powyższego zestawienia widać, że zastosowane roztwory koloidalne dają wyniki prawie identyczne, gdyż zawartości procentowe arsenu i siarki w wytrąconych osadach są bardzo do siebie zbliżone. Zatem w przypadku Neosalutanu każdy z wymienionych wodorotlenków koloidalnych ma prawie tę samą zdolność strącającą. Odmienne zjawiska spostrzeżono przy badaniu serii 116 Sulfarsolanu, z którego koloidalny roztwór wodorotlenku niklu wytrącał największą ilość związku, zaś koloidalny wodorotlenek magnezu — najmniejszą.

W pracy niniejszej wspomniano niejednokrotnie, że w celu wytrącenia połączeń arsenobenzenowych z roztworów wodnych neosalwarsanów w postaci niezmienionej, należy stosować roztwory wodorotlenków koloidalnych. Aby jeszcze raz wykazać, że do tego celu nie nadają się roztwory soli bez dodatku koloidów dodatnich, wykonano następujące doświadczenie: do substancji serii 32 Neosalutanu dodano kilkanaście cm³ 5%-go roztworu chlorku chromowego, nie zawierającego wodorotlenku chromu. Osad nie od razu zaczął się wydzielać, lecz dopiero po pewnym czasie. Po odsączeniu i zanalizowaniu znaleziono w nim 10,64% As, czyli 0,07105 wiązań —As=As— oraz 2,75% S czyli 0,0857 gramoatomów S. Stosunek molowy —As=As— : S=0,829, zatem mamy tu do czynienia ze związkiem chromowym w znacznej już części rozłożonym, gdyż przeważa w nim związek jednołańcuchowy.

Podobny wynik otrzymuje się, analizując osad, wytrącony za pomocą kwasu solnego, co również wskazuje na to, że kwas solny rozkłada związki dwułańcuchowe, przekształcając je w związki jednołańcuchowe*).

*) Podobne rozkłady odbywają się również po zagotowaniu roztworów zawierających osady, a także — podczas przechowywania w eksikatorze wypełnionym azotem — osadów odsączonych, przemytych wodą i wysuszonych.

Badania moje wykazują przeto, że wszystkie rodzaje polskich odmian neosalwarsanów są związkami arsenobenzenowymi dwułańcuchowymi, z nieznaczną domieszką związków jednołańcuchowych.

W związkach dwułańcuchowych są zawarte pochodne trwałe, które nazwaliśmy symetrycznymi, oraz mniej trwałe, zwane niesymetrycznymi.

Ilość siarki ubocznej waha się od 2 do 3 procent, ilość zaś siarki w związkach jednołańcuchowych nie przekracza na ogół 1%.

We wszystkich łańcuchach bocznych jest zawarte przeciętnie 7% siarki, a w rdzeniu jest związane około 0,5% siarki (procenty obliczano w stosunku do substancji wyjściowej neosalwarsanu).

Zatem t. zw. neosalwarsan nie jest związkiem pojedynczym, lecz składa się z całego szeregu różnych związków.

Otrzymane wyniki zaprzeczają dotychczasowym poglądom, że odmiany polskich neosalwarsanów, a jak się okaże z dalszych badań, także i niemieckich produktów, są związkami jednołańcuchowymi.

Do tego ostatniego wniosku prowadzi analiza osadów wytrącanych z roztworów wodnych neosalwarsanów za pomocą kwasu solnego (zwykła metoda kwasowa¹¹⁾ oraz metoda zmodyfikowana przez St. Jurkowskiego).

W obliczu tego nasuwa się pytanie, czy wyniki, otrzymane według metod chromowej i torowej odpowiadają rzeczywistości, a więc czy zbadane w pracy niniejszej rodzaje arsenobenzoli mają postać istotnie dwułańcuchową.

Można przecież przypuścić, że neosalwarsany handlowe są jednołańcuchowe, jak to wykazuje metoda kwasowa, ze znacznieszą domieszką wolnego rongalitu, który pod wpływem wodorotlenków koloidalnych, mogących odgrywać rolę katalizatorów, kondensuje się z grupami aminowymi neosalwarsanu, w wyniku czego powstają wyżej podstawione rongalitem pochodne arsenobenzenu.

Przypuszczenia tego nie potwierdza jednak doświadczenie. Wykonano je w sposób następujący: z roztworu wodnego jednego grama handlowego neosalwarsanu strącono za pomocą 10 cm³ 10%-owego kwasu solnego neokwas. Osad odsączono, przemyto kilkanaście razy wodą, pozbawioną tlenu, następnie zaś alkoholem i eterem, po czym wysuszono go w eksikatorze wypełnionym azotem. Wszystkie czynności związane ze strącaniem, wykonano w atmosferze azotu.

Po zupełnym wyschnięciu preparatu oznaczono w nim zawartość arsenu i siarki. Znalezione: 29,77% arsenu (0,1987 wiązań —As=As—) i 6,52% siarki 0,2034 gramoatomów S), co daje stosunek molowy —As=As— : S=0,977, a więc bardzo bliski jedności. Wskazuje to, że preparat otrzymany jest związkiem jednołańcuchowym, wystarczająco czystym.

Jeśli metoda chromowa daje wyniki zgodne z rzeczywistością, to zastosowanie jej do zbadanego powyżej neo-kwasu winno doprowadzić do tych samych wyników, co metoda kwasowa. Należy zatem wykazać, czy nie następuje kondensacja wolnego rongalitu, dodanego w czasie wykonywania doświadczenia, z grupami aminowymi ugrupowań arsenobenzenowych, oraz, czy te ugrupowania zostają wytrącone ilościowo za pomocą roztworu chromowego.

Doświadczenie wykonano w sposób następujący: do dwóch słoików odważono po 0,15 g powyższego preparatu, substancje rozpuszczono w jednakowych ilościach 0,1-n NaOH, po czym zobojętniono, stosując jako wskaźnik metyloranż, nadmiar ługu za pomocą 0,1-n HCl.

Do otrzymanych w ten sposób roztworów neosalwarsanu jednołańcuchowego dodano po 0,1 g wolnego rongalitu i po 15 cm³ roztworu chromowego. Wytrącone osady odsączono i przemyto wodą. W jednym z nich oznaczono zawartość procentową arsenu, w drugim zaś siarki, licząc na substancję wyjściową.

Znalezione: 29,59% As czyli 0,1975 wiązań —As=As— i 6,58% S czyli 0,2053 gramoatomów S, co wskazuje na stosunek molowy —As=As— : S=0,962, a więc taki sam, jak dla neo-kwasu.

Widzimy więc, że kondensacja tu nie następuje. Zestawiając wyniki analizy metodą chromową neosalwarsanów handlowych bez i po potraktowaniu ich kwasem solnym dochodzimy do wniosku, że kwas mineralny powoduje rozkład związków dwułańcuchowych do związków jednołańcuchowych, i że z tego względu metoda kwasowa prowadzić musi do wyników z gruntu fałszywych.

* * *

Na zakończenie podajemy dla porównania wyniki analiz preparatu niemieckiego: Neosalwarsan H. No. VJZB. „Bayer“

I. G. Farbenindustrie Aktien Gesellschaft (Natriumsalz der m-Diamino-p-dioxyarsenobenzo'metylensulfoksyłsäure), prze-
prowadzone metodą chromową:

S ₁	S ₂	S _n	S _s	S _c	$\frac{As = As - S}{S}$
0,91	6,00	2,16	3,84	1,86	0,569

Jak widzimy, skład neosalwarsanu bayerowskiego nie różni się w zasadzie niczym od składu neosalwarsanów polskich, gdyż występują w nim głównie związki dwułańcuchowe.

Autor pracy niniejszej zamierza przystąpić do badań, które mają wykazać, czy wynalezione przez niego metody analiz neosalwarsanów nie dałyby się zastosować do wykrywania innych jeszcze związków aromatycznych, posiadających grupy aminowe i fenolowe — grupy te omożna bowiem „zronga-litować” i działać na otrzymane w ten sposób związki roz-tworem chromowym lub torowym i — w razie powstania osadu — poddać go analizie.

Spodziewa się on, że ci spośród chemików, zarówno krajowych jak i zagranicznych, których praca niniejsza mogłaby zainteresować, podadzą właściwą interpretację otrzymanych przez niego wyników doświadczalnych, gdyż podane interpre-tacje są w dużej mierze hipotetyczne.

STRESZCZENIE

Celem pracy niniejszej było zbadanie składu różnych odmian handlowych neosalwarsanów.

Autorowi tej pracy udało się wynaleźć właściwe metody, które umożliwiają wykrywanie rodzaju związków, występujących w danym preparacie. Wykazał on, że stosowana do tego celu metoda kwasowa¹¹⁾ prowadzi do otrzymania wyników zupełnie błędnych, gdyż kwas mineralny powoduje od-czepianie jednego z łańcuchów bocznych od cząsteczek związków dwułańcuchowych.

Zastosowane nowe metody polegają na wytrącaniu w środowisku obojętnym związków arsenobenzenowych w postaci nierozpuszczalnej za pomocą koloidalnych wodorotlenków metalicznych, należących, jak wiadomo, do grupy koloidów dodatnich.

Do badań użyto koloidalnego roztworu wodorotlenku chromowego i torowego. Pierwszy otrzymywano przez zmie-

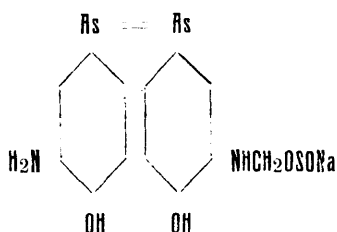
szanie 10 cm³ 5%-owego CrCl₃ z 6 cm³ 1/2 normalnego NaOH, drugi — 10 cm³ 5%-owego ThCl₄ z 5 cm³ n/2 NaOH.

Roztwór chromowy wytrąca osad barwy jabłkowo-zielonej, roztwór torowy — osad barwy żółtej. Następuje tu podstawienie atomu sodu łańcuchów rongalitowych względnie formaldehydosiarczynowych przez skomplikowane ugrupowania koloidów chromowego względnie torowego.

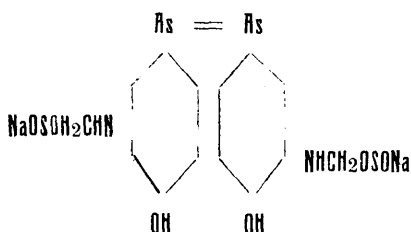
Osady po odsączeniu i przemyciu wodą (w atmosferze azotu) badano na zawartość procentową arsenu i siarki w stosunku do użytej ilości neosalwarsanu, skąd wyliczano stosunek molowy — As=As---:S; jeśli wartość jego jest bliska 1, wówczas związek wytrącony jest jednolącuchowy; jeśli natomiast wypada dla niego liczba bliska 1/2, należy wnosić, że związek jest dwulącuchowy.

Badania przeprowadzone według tych metod wykazały, że polskie odmiany neosalwarsanów (Sulfarsolan, Novarsenobenzol i Novarsolen firmy „Ludwik Spiess i Syn, S. A.“, Neosalutan firmy „Hydrox“ oraz Spironovan firmy „B. Krogulecki“) są związkami głównie dwulącuchowymi. To samo dotyczy preparatu niemieckiego H. No. VJLB. „Bayer“.

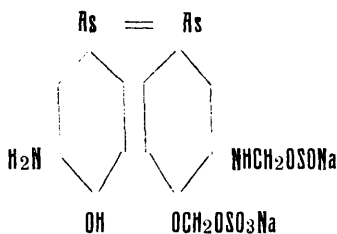
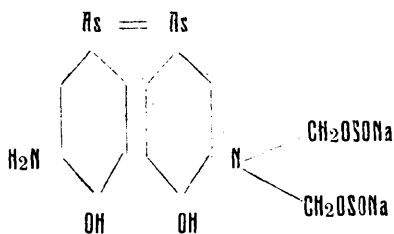
W skład preparatów powyższych wchodzi — prócz związku jednolącuchowego — związki dwulącuchowe symetryczne i niesymetryczne. Handlowe neosalwarsany polskie składają się zatem głównie z połączeń następujących:



Związek jednolącuchowy



Związek łańcuchowy symetryczny



Związki dwulącuchowe niesymetryczne.

Zawartość związku jednołańcuchowego wynosi od 9 do 21%, związków dwułańcuchowych natomiast 41—64% w tym 20—32% związków dwułańcuchowych symetrycznych oraz 24—32% związków niesymetrycznych. Związki symetryczne i niesymetryczne występują często w równych prawie ilościach.

Praca niniejsza doprowadziła również do metody oznaczania t. zw. siarki ubocznej czyli siarki, nie związanej ani w rdzeniu, ani w łańcuchach bocznych. Należy tu siarka, zawarta w siarczanie, siarczynie, rongalicie i formaldehydosiarczynie sodowym. Zawartość jej wynosi 17—42% w stosunku do ogólnej ilości siarki wolnej i związanej w łańcuchach bocznych, względnie 1,6—4% w odniesieniu do substancji pierwotnej neosalwarsanu. (Stosując ten ostatni sposób obliczania, otrzymuje się na ilość siarki w związku jednołańcuchowym 0,64—1,45%, zaś na ilość siarki w związkach dwułańcuchowych: 4,66—7,30%).

Reasumując można więc powiedzieć, że skład neosalwarsanów, produkowanych przez polskie zakłady przemysłowe („L. Spiess i Syn, S. A.“, „Hydrox“ i „B. Krogulecki“) i niemiecką firmę „Bayer“, jest zupełnie inny, niż podawany na etykietach, które orzekają, że produkty, dopuszczane do użytku, odpowiadają neosalwarsanom jednołańcuchowym.

S U M M A R Y.

The aim of the present work is to establish the components of different kinds of neosalwarsan available on the pharmaceutical market.

The author has elaborated a method which allows for the determination of the composition of the examined substance. He has shown that acid method¹¹⁾ leads to erroneous results as a mineral acid causes the separation of one of the side chains from the molecules of two-chained compounds.

The new method is based on precipitation of the insoluble arseno-benzenic compounds in a neutral medium, by means of the colloidal metallic hydroxides, which, as it is known, belong to the group of the positive colloids.

A colloidal solution of the chromic and the thorium hydroxide have been used in the experiments. The former was received by mixing 10 ml of 5% CrCl_3 with 6 ml of $\frac{1}{2}$ n NaOH, and the latter — 10 ml of 5% ThCl_4 with 5 ml of $\frac{1}{2}$ n NaOH.

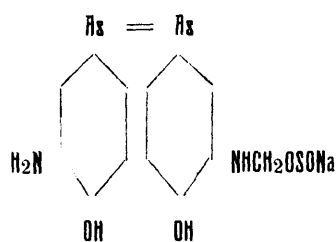
The chromic solution precipitates an apple-green sediment and the thorium solution — a yellow one. There occurs here

a substitution of the sodium atom of the rongalite or formaldehydysulphite chains by complicated agglomerates of chromic or thorium colloids.

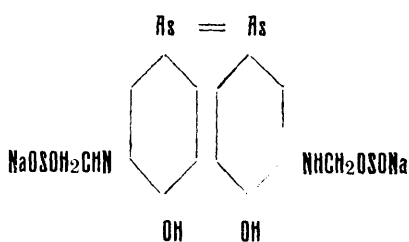
After been filtrated and water washed (in nitrogen atmosphere) the precipitates were analysed for the percentage of arsenic and sulphur in relation of the amount of the used neosalvarsan and from this the molar equivalence — $\text{As}=\text{As}$ — : S was calculated. In the case that the value of this relation is near to 1, the precipitated compound is a one — chained one, but when it approaches to $1/2$, the compound is two — chained.

The investigations carried with these methods have indicated, that the Polish kinds of neosalvarsans (Sulfarsolan, Novarsenobenzol and Novarsolen of the firm „Ludwik Spiess i Syn, S. A.“, Neosalutan of the firm „Hydrox“ and Spironovan of the firm „Krogulecki“ are chiefly the two-chained compounds. The same results were obtained with German preparation H. No. VJZB „Bayer“.

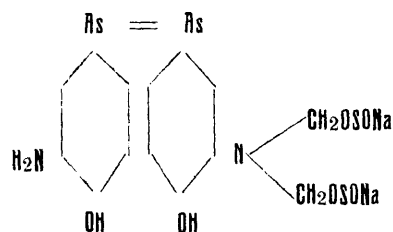
The above mentioned preparations are composed of one-chained, and two-chained compounds, asymmetrical as well as symmetrical. The commercial types of Polish neosalvarsans are chiefly composed from the following compounds:



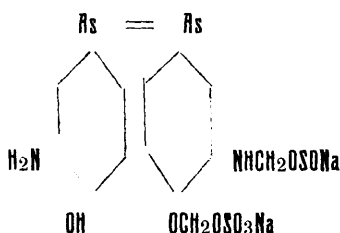
One — chained compound



Two — chained
symmetrical compound



Two — chained
asymmetrical compounds



The amount of one-chained compounds is found to be from 9 to 21% and those of two-chained — 41 to 64%, in the last group the symmetrical compounds are 20—32% and the asymmetrical ones — 24—32%.

The symmetrical and asymmetrical compounds appear usually in nearly equal amounts.

According to these results it may be stated, that the compositions of the neosalvarsans produced by the Polish pharmaceutical laboratories and the German laboratory „Bayer“ are quite different from those indicated on the labels, as it is stated there that the products, admitted for use, are equivalent to one-chained neosalvarsans only.

Chemical Departement of State Institute of Hygiene in Warsaw.

PRZYPISY

- 1) Materiały do Farmakopei Polskiej 1926 — 402.
Pharmacopea Helvetica 1933 — 637.
Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis 1925, I, 577.
Winterfeld. Organisch-präparative. Pharmazeut. Chemie 1937 — 133.
A. Lespagnol. Pharmacie Chimique 1936 — 772.
Chemisches Zentralblatt 1926, I, 2511, 1934, I, 3732.
J. Chem. Soc. London 1934 — 1708 — 18.
- 2) E. Fourneau. Heilmittel der Organischen Chemie u, ihre Herstellung 1927 — 117.
Chemisches Zentralblatt 1925, I, 1367; 1936, I, 1856.
Journ. Americ. Soc. 44, 2573 — 77.
Journ. Chem. Soc. London 1935, 1745 — 47.
E. Fourneau. Heilmittel der Org. Chem. u. ihre Herstellung D. R. P. Nr 249, 726.
A. Lespagnol. Pharmacie Chimique 1936 — 773.
- 3) i 4) Chemisches Zentralblatt 1936, I, 996.
Journ. Americ. Chem. Soc. 45, 1923 — 2184.
- 5) Zeitschrift für Analytische Chemie, 85 — 480 (1931).
- 6) Zeitschrift für Analytische Chemie 102, 11 (1935).
- 7) Treadwell, II, 584.
- 8) Gosudarstwiennaja Farmakopieja Sojuza Sowjetskich Socialistycznych Riepublik 7 wydanie, str. 532.
- 9) Berl-Lunge. Chemisch-technische Untersuchungsmethoden B. III, S. 981.
- 10) Farmaciewitczeskiye Prieparaty — Sprawocznik — On-ti (1934), 384.

- 11) Tamże, str. 385.
 - 12) Journ. Ind. Eng. Chem. 14, 624/1922.
 - 13) Farmaceutičeskie Prieparaty — Sprawocznik — On-
ti (1934), 384.
 - 14) Treadwell, II, 398.
 - 15) Treadwell, II, 167.
 - 16) U. S. Pub. Health S. Rep. 40, 1235 (1925).
 - 17) Journ. Americ. Chem. Soc. 50, 191—96; Journ. pharm.
Assoc. 16, 1149—52 (1927).
 - 18) Journ. Chem. Soc. Zond. 1708 — 18 (1934).
-

Dział Chemii Państwowego Zakładu Higieny
Naczelný Dyrektor: Prof. Dr F. Przesmycki

PRZEMIANA MATERII PRĄTKÓW GRUŻLICY

(ciąg dalszy)

ERNEST ALEKSANDER SYM

III. Część doświadczalna.

A. Ogólna przemiana organiczna podczas rozwoju prątków grużlicy (typów: H3, H5, bydlęcego 801 i B.C.G.).

Doświadczenie 1.

Wzrostowa przemiana materii szczepu ludzkiego H3
hodowanego na pożywce NK.

a) Ogólne dane. Do tego doświadczenia użyto kolbę o objętości 5809 ml, 200 ml pożywki NK i mieszaninę gazową składającą się z 46,25% tlenu i 53,75% azotu. W temp. 19,1° ciśnienie gazu wewnątrz kolby wynosiło 676,5 mm Hg. Po 35 dniach hodowli szczepu H3 otrzymanego od dra Celarka z firmy Klawe, gdzie był użyty do produkcji tuberkuliny, powstał w temp. 37° obfity kożuch pokrywający całą powierzchnię podłoża. Wraz z doświadczeniem głównym wykonano dwie próby kontrolne, jedną prowadzono równolegle z samym doświadczeniem bez wysiewania drobnoustroju, drugą analizowano na wszystkie składniki tylko na początku doświadczenia. Analizy pierwszej próby przeprowadzano równocześnie z wszelkimi analizami głównego doświadczenia. Trzydziestopięciodniowy pobyt pierwszej próby kontrolnej w termostacie nie wpłynął na zmianę jej składu chemicznego: różnice w wynikach analiz tych dwóch prób kontrolnych były identyczne przy uwzględnieniu dopuszczalnych granic błędu doświadczalnego.

Na tablicy IV są podane wyniki pierwszego doświadczenia.

b) Przemiana węglowa. Równanie bilansowe dla wykazania ilości węgla katabolitów organicznych, ułożone na podstawie danych tablicy przedstawia się następująco:

(1) $\approx C^{\text{II}} \text{org.} = \approx C^{\text{I}} - C_m - C_{\text{CO}_2} = 1006,6 - 491,0 - 533,2 = 17,6$.
Odejmując zatem od sumy organicznego węgla pobranego przez drobnoustrój od poszczególnych substratów $\approx C^{\text{I}}$ obliczonego na podstawie indywidualnych analiz substratów) węgiel odłożony w prątkach C_m i węgiel powstałego bezwodnika węglowego otrzymuje się wielkość stosunkowo bardzo małą i absurdalną, bo ujemną.

Uwzględniając dopuszczalne granice błędu doświadczalnego można powiedzieć, że prątki szczepu H3 w czasie swego rozwoju w korzystnych warunkach praktycznie nie wytwarzają związków organicznych (katabolitów). Znany jest fakt, że już we wczesnym okresie rozwoju prątków ukazuje się tuberkulina w podłożu. Stwierdziliśmy również, że już w drugim tygodniu hodowli reakcja Molischa wykonana na pożywce wypada dodatnio. Z powyższych i innych danych tu nie wymienionych wynika, że ilość pewnych substancji wydzielanych do podłoża przez prątki (może biologicznie bardzo czynnych i ważnych) w okresie ich rozwoju, musi być stosunkowo bardzo mała i dlatego w ogólnym bilansie pierwiastkowym nie może ona odgrywać roli. Dla stwierdzenia dobrze wykonanych analiz, zastosujemy równanie określające ubytek węgla organicznego w roztworze, a otrzymany rezultat porównamy z doświadczalnym wynikiem analizy ubytku węgla organicznego:

2) $C \text{ org. mokr. met.} = \approx C^{\text{I}} - \approx C^{\text{II}} \text{org.} - C_m + C_{\text{CO}_2}$, $1006,6 + 17,6 = 491,0 + 533,2 = 1024,2$. Doświadczalnie otrzymano 1025,0, co jest niespodziewanie zgodne z poprzednią liczbą i zarazem potwierdzeniem dobrze wykonanych analiz.

c) Przemiana azotowa. Podstawiając w równaniach bilansowych przeznaczonych dla przemiany azotowej dane z tablicy IV otrzymujemy:

$$(II) \Delta \approx N = N_m (74,5) = (74,7).$$

Jak widać z tego, ubytek azotu całkowitego, oznaczony metodą Parnasa i Wagnera (74,5 mg na 100 ml pożywki), jest bardzo zbliżony do ilości azotu znalezionej w prątkach (74,7 mg).

$$(I) \approx N^{\text{II}} \text{organ.} = \approx N^{\text{I}} - \Delta \approx N (\text{lub } N_m) - N_{\text{NH}_3}$$

$$\approx N^{\text{II}} \text{organ.} = 126,2 - 74,6 (\text{średnio}) - 50,1 = +1,5.$$

Zatem ilość wydzielonych katabolitów organicznych zawierających azot równa się sumie azotu organicznego pobranego od poszczególnych substratów $= \approx N^I$ pomniejszonej o ilość azotu odłożonego w prątkach i o ilość azotu powstałego amoniaku NH_3 . Z ostatniego równania wynika, że oprócz amoniaku żadne inne związki azotowe nie wydzielają się praktycznie ani do podłoża, ani do fazy gazowej.

W sprawie przemiany azotowej trzeba pewnego uzupełnienia. O przemianie asparaginy wnioskowaliśmy z następujących przemian: z przemiany azotowej całkowitej, ze znikania azotu aminowego (N_{amin}) i azotu amidowego (N_{amid}) oraz z tworzenia się azotu amoniakalnego. Na podstawie wielu doświadczeń przekonano się, że w obecności glicerolu równolegle ze znikaniem grupy aminowej asparaginy, znika asparagina jako całość. Z naszych badań nie można wywnioskować, czy najpierw przebiega dezaminacja względnie dezamidacja i dezaminacja z wytworzeniem amoniaku, a po tym pochłanianie pozostałej reszty asparaginy jako kwasu bursztynowego, czy cała asparagina względnie cały kwas asparaginowy ulega resorbcji, czy wreszcie oba procesy zachodzą obok siebie. Niewątpliwie prątki posiadają silną asparaginazę co stwierdziliśmy wielokrotnie, a szczególnie przy działaniu prątków na asparaginę w warunkach beztlenowych. Natomiast działanie dezaminacyjne prątków na asparaginę bez jej resorbcji stwierdza się tylko przy podaniu do podłoża asparaginy jako jedynego związku organicznego w warunkach tlenowych. Stwierdzono również, że kwas bursztynowy jest dla prątków dobrym substratem. Na podstawie wymienionych faktów przyjęliśmy w naszych rozważaniach bilansowych, że cała asparagina względnie cały kwas asparaginowy ulega resorbcji. Takie założenie ma wpływ tylko na ogólną przemianę wodną i to nie wielki. Mianowicie, gdybyśmy przyjęli najpierw całkowitą hydrolizę asparaginy na amoniak i kwas bursztynowy a po tym resorbcję tych dwóch produktów to wprowadzilibyśmy do ustroju wodę hydratacyjną. Obliczenie jaka ilość asparaginy i jaka kwasu asparaginowego została wchłonięta wykonujemy w następujący sposób. Mamy dane: ubytek azotu aminowego $= N_{amin}$, ubytek azotu amidowego N_{amid} i ilość powstałego w podłożu amoniaku NH_3 . Zawsze $N_{amid} > N_{amin}$, a oprócz tego podczas rozwoju prątków często mamy $N_{amin} < NH_3 < 2N_{amin}$. Biorąc pod uwagę brak katabolitów organicznych (z wyjątkiem kwasu

Tablica IV.

Doświadczenie 1. Bilans pierwiastkowy organiczny dla szerepu H3 rozwijającego się na pożywcę NK w mg. (przeliczony na 100 ml pożywki).

	Ubytek w %	C	O	H	N	Masa pobranych i wydzielonych związków
Glicerol	45,8	809,1	1078,8	181,2		2069,1
Asparagina (bezw.)	71,0	181,7	181,7	30,1	N amin. 52,8 N amid. 73,3	499,1
Popr. na kw. asp.			+ 33,8	— 2,1	N asp. 46,4 N kwas 29,6	2,1
Kw. cytryn. (bezw.)	22,9	15,1	23,5	1,7		40,3
Cytryn. żel. amon.	41,0	0,7	1,3		0,1	2,1
Tlen wolny	98,7		1489,0			1489,0
Suma pierwiastków i całkowita masa pobran. związków		1006,6	2808,1	210,9	126,2	4101,7
Skład pierwiastkowy bakterii (bez popiołu)		491,0	221,2	70,8	74,7	857,7
Różnica. Wydzielona ilość		515,6	2586,9	140,1	51,5	3244,0
Ubytek całkowitych C i N z pożywki		1025,0			74,5	
Ilość C i O w CO ₂ (gaz + pożywka)		533,2	1421,8			1955,0
Ilość pozostałego O i H i obliczonego H ₂ O			1165,1	140,1		H ₂ O z H = 1264 H ₂ O z O = 1311
Oznaczona ilość NNH ₃					50,1	

Tablica V.

Doświadczenie 2. Bilans pierwiastkowy organiczny dla szerepu 45 rozwijającego się na pożywe NK w mg (przeliczony na 100 ml pożywki)

		Ubytek 2%	C	O	H	N	Masa pobranych i wydzielonych związków
Związki pobrane ze środowiska	Glicerol	33,7	592,4	789,9	132,7		1515,0
	Asparagina (bezw.)	63,2	160,1	160,1	26,9	N amin. 46,7 N amid. 55,2	440,5
	Popr. na kwas asp.			+ 43,7	— 2,7		
	Kw. cytryn. (bezw.)	37,2	28,6	41,6	3,0		71,4
	Cytryn. żel. amon.	30,6	0,4	0,8		0,1	1,4
Tlen wolny		100		1165,4			
Suma pierwiastków i całkowita masa pobran. związków			781,5	2201,5	159,9	102,0	2028,3
Skład pierwiastkowy prątków (bez popiołu)			367,6	176,4	49,6	56,4	650,0
Różnica. Wydzielona ilość			413,9	2025,1	110,3	45,6	1378,3
Ubytek całkowitych C i N z pożywki			791,4			55,2	
Związki wydalone	Ilość C i O w Co ₂ (gaz pożywką)		429,7	1145,9			1575,6
	Ilość pozostałego O i H i obliczonego H ₂ O			897,2	110,3		993,6
	Oznaczona ilość NH ₃					46,7	56,7

asp.) można wnioskować, że nie tylko asparagina została zresorbowana jako całość, ale też i kwas asparaginowy po dezamidacji asparaginy i po pozostawieniu NH_3 w podłożu. Ilość zresorbowanego azotu aminowego tak asparaginy jak i kwasu asparaginowego wyrażono jako N amin. Ilość wchłoniętego N aminowego jest zawsze większa od ilości wchłoniętego N amidowego, gdyż: $\text{N amid} - \text{NNH}_3 < \text{N amin}$. Ilość zresorbowanej asparaginy jako całość, podana w ilości azotu tak aminowego jak i amidowego równa się: $\text{N asp.} = 2/\text{N amid} - \text{NNH}_3$. Ilość wchłoniętego kwasu asparaginowego podana w ilości azotu aminowego kwasu równa się: $\text{N kwas} = \text{N amin} - (\text{N amid} - \text{NNH}_3)^1$. Zatem w omawianym doświadczeniu ilość wchłoniętego azotu asparaginowego (N asp. t. zn. aminowego i amidowego w równej ilości) równa się 46,4 mg, a to dlatego, ponieważ ubytek azotu pochodzenia amidowego przez resorbcję równa się $73,3 - 50,1 = 23,2$, podwójna ilość tego odpowiada całkowitemu azotowi asparaginy. Natomiast ilość zresorbowanego azotu kwasu asparaginowego (N kwas) wynosi $52,8 - 23,2 = 29,6$ mg., Można inaczej powiedzieć, że 29,6 mg NNH_3 pozostało w podłożu z tej części asparaginy, która została wchłonięta i zużyta jako kwas asparaginowy. Ze względu na to, że w kwasie asparaginowym zamiast grupy amidowej mamy grupę OH, należy wprowadzić do bilansu ogólnego odpowiednią poprawkę, dodając 33,8 mg tlenu w kolumnie tlenowej, w kolumnie zaś wodorowej odejmując 2,1 mg wodoru (przy zamianie NH_2 na OH ilość wodoru maleje). Ilość kw. aspar. pozostałego w pożywce po dezamidacji wyrażona w azocie aminowym równa się:

$$\text{NNH}_3 - \text{N kwas} = 50,1 - 29,6 = 20,5.$$

d) Przemiana wodna. Z przemiany tlenowej i wodorowej mamy następujące dane:

$$\begin{aligned} \text{O reszta} &= \triangleq \text{O}^I - \text{Om} - \text{Oco}_2 = 2808,1 - 221,2 - 1421,8 = \\ &= 1165,1 \text{ mg} \triangleq \text{H}^{II} = 140,1 \text{ mg.} \end{aligned}$$

Dla utlenienia tej pozostałej ilości wodoru potrzeba 1121 mg O_2 , zatem obliczając ilości wydzielanej wody z utlenienia pozostałego wodoru, otrzymujemy 1261 mg H_2O . Natomiast obliczając ilość wydzielonej wody z O reszty (1165,1) otrzymujemy 1311 mg H_2O . Można przyjąć, że średnio powstało 1286 mg

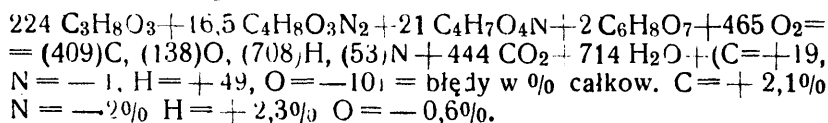
¹⁾ Ilość wchłoniętego azotu z kwasem asparaginowym można też inaczej obliczyć mianowicie: $\text{N kwas} = \triangleq \text{N} - \text{N asp.} = \text{Nm} - \text{N asp.}$ ($74,7 - 46,4 = 28,3$). Jest to liczba nieco mniejsza od otrzymanej za pomocą pierwszego wzoru (29,6).

H₂O. Ilość wytworzonej wody przekracza znacznie ilość powstałej masy bakteryjnej 857,7 mg (bez popiołu) (t. zn. około 50% masy bakteryjnej).

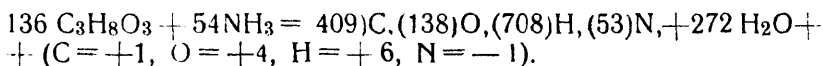
e) Przemiana gazowa. Iloraz oddechowy w tym doświadczeniu wynosi 1421,8:1489,0 czyli 0,955. Ilość odłożonego węgla w prątkach (491 mg) jest mniejsza od ilości węgla wydzielonego pod postacią Cco₂ = 533,7.

f) Równania względne przemiany organicznej. Skład pierwiastkowy szczepu H₃ w procentach bez wliczenia popiołu, którego zawartość w prątkach wynosi 3,52%, przedstawia się następująco: C = 57,25%, O = 25,79%, H = 8,25%, N = 8,71%. Na podstawie podanego składu pierwiastkowego stworzmy wzór względny prątków: (409)C, (138)O, (708)H, (53,4)N. Według podanego wzoru dla związków azotowych obliczony iloraz spaleniowy prątków wynosi 0,857. Ilorazy spaleniowe asparaginy i kwasu cytrynowego są sobie równe i wynoszą 1,333. I. S. glicerolu = 0,857. A więc glicerol jest równoilorazowy, a poprzednie dwa związki są nadilorazowe w stosunku do prątków.

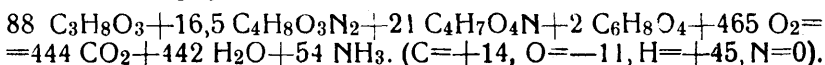
Z danych doświadczalnych podanych w tablicy IV ułożone równanie względne dla całkowitej przemiany organicznej przedstawia się następująco:



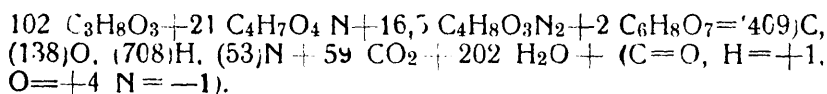
Przyjmujemy pierwszą skrajną ewentualność mianowicie, że w budowie drobnoustroju bierze udział tylko glicerol jako związek organiczny, natomiast azot pod postacią amoniaku zostaje pobrany ze związków azotowych, które po całkowitej dezaminacji zostają utlenione wraz z kwasem cytrynowym na CO₂ i H₂O. Przy takim założeniu i przy zastosowaniu wzorów dla substratu równoilorazowego (przedstawionych w części teoretycznej) otrzymuje się następujące równanie dla procesu konstrukcji ciała drobnoustrojowego:



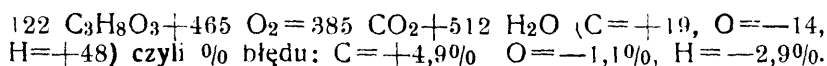
Odpowiednie równanie określające całkowite utlenienie pozostałej reszty substratów z wydzielaniem amoniaku przedstawia się następująco:



Przy drugiej skrajnej możliwości t. zn. gdy przyjmujemy całkowity udział związków nadilorazowych w budowie ustroju, otrzymujemy następujące równanie przeznaczone dla procesu konstrukcji ustroju z substratów nadilorazowych (stosując wzory z części teoretycznej pracy):



Odpowiednie równanie odtwarzające całkowite utlenienie pozostałego glicerolu równa się:



Z pewnością, — szczególnie uwzględniając wyniki późniejszych doświadczeń jak np. nad przemianą samego glicerolu i asparaginy — faktyczna przemiana znajduje się pomiędzy tymi skrajnymi możliwościami.

g) Wnioski. Nawet na podstawie równań wyrażających skrajne ewentualności budowy ciała ustrojowego z substratów organicznych można wyciągnąć już następujące wnioski: 1) Glicerol stanowczo bierze udział w budowie ciała prątkowego, a mianowicie, przy pierwszym założeniu, jeśli przeliczymy na udział węgla pochodzenia glicerolowego, = 100%, przy drugim założeniu = 75%. 2) Nie ulega najmniejszej wątpliwości, że z procesem budowy ciała drobnoustrojowego jest związane silne odwodnienie substratów — nazwane przez nas dehydratacją biosyntetyczną.

W obu skrajnych założeniach mamy tworzenie się wielkich ilości wody z dehydratacji biosyntetycznej. W pierwszym przypadku mniej więcej na 1 cząsteczkę glicerolu przypadają 2 cząsteczki wody dehydratacyjnej. Ilość ta wynosi 38% całkowitej wydzielonej wody, a 49% utworzonej suchej masy bakteryjnej. Przy drugim założeniu ilość powstałej wody dehydratacyjnej jest mniejsza. I tutaj również ilość cząsteczek powstałej wody jest dwa razy większa od ilości pobranego glicerolu. Ilość powstałej wody dehydratacyjnej wynosi 28% całkowicie wydzielonej wody oraz około 40% suchej masy bakteryjnej. W pierwszym założeniu trzeba by uwzględnić możliwość dehydratacji wywołanej przez przyłączenie amoniaku.

Doświadczenie 2.

Wzrostowa przemiana materii szczepu H5 typu ludzkiego hodowanego na pożywce NK.

a) Ogólne dane. Prątki szczepu H5 hodowano w kolbie o obj. 2224,5 ml na 100 ml pożywki NK z mieszaniną gazową składającą się z 41,89% tlenu i z reszty azotu. W temp. 15,4° ciśn. wewnątrz kolby wynosiło 747 mm Hg. Po 35 dniach hodowli (był to piąty z kolei pasaż na tej pożywce po przesianiu z kartofla) kożuch średniej grubości pokrywał całą powierzchnię podłoża. Wykonano próby kontrolne jak w doświadczeniu poprzednim. Wyniki doświadczenia są podane na tablicy V.

b) Przemiana węglowa. Podstawiając dane doświadczalne w równaniach bilansowych

(1) $\Delta \approx C^{II} \text{ org.} = \approx C^I - C_m - C_{CO_2}$ otrzymujemy: $781,5 - 367,6 - 429,7 = -5,8$. (2) $\Delta \text{ Corg. mokr. met} = \approx C^I - C^{II} \text{ org.} = C_m + C_{CO_2}$ otrzymujemy $781,5 (-5,8) = 367,6 - 429,7 = 797,3 \text{ mg C.}$

Ostatnia liczba, obliczona, jest bardzo zbliżoną do otrzymanej doświadczalnej, która wynosi 791,4 mg C. Na podstawie tych liczb możemy wnioskować, że prątki szczepu H5 typu ludzkiego tak samo jak poprzedniego szczepu H3 nie wytwarzają praktycznie związków organicznych podczas swego rozwoju.

c) Przemiana azotowa. Równania bilansowe przeznaczone dla przemiany azotowej przedstawiają się następująco:

(1) $\Delta \approx N = N_m$. Ubytek azotu całkowitego z pożywki = 55,2. Znalazona ilość azotu w prątkach = 56,4 mg. (2) $\approx N^{II} \text{ org.} = \approx N^I - \Delta \approx N \text{ lub } N_m - N_{NH_3}$. Podstawiając dane doświadczalne otrzymujemy $102,0 - 55,2 \text{ (lub } 56,4) - 46,7 = -0,3$.

Jak widzimy i w tym doświadczeniu oprócz amoniaku żadne inne związki azotowe nie wydzielają się praktycznie do podłoża.

Z liczb odnoszących się do przemiany azotowej można podobnie jak w poprzednim doświadczeniu obliczyć, że zaledwie 8,5 mg N zostało wchłoniętych z grupy amidowej asparaginy, a cała reszta N, t. zn. 46,7 mg z grupy aminowej. Z tego wynika, że 38,2 mg N wchłonęło się z kwasem asparaginy, jako produktem dezamidacji asparaginy. Podob-

nie jak w poprzednim doświadczeniu wprowadzono i tutaj odpowiednie poprawki w kolumnach O i H. J. Debiesse¹⁾ utrzymuje, że enzym dezamidujący asparaginę znajduje się po za bakteriami (szczep B.C.G.) w podłożu. Nam jednak nie udało się stwierdzić obecności asparaginazy w podłożu bakteriynym. Jesteśmy skłonni przypuszczać, że prątki same katalizują tę reakcję w takich rozmiarach, że ilość powstałego NH_3 przekracza w dużym stopniu zapotrzebowanie drobnoustroju w amoniak i dlatego też pozostaje on w środowisku.

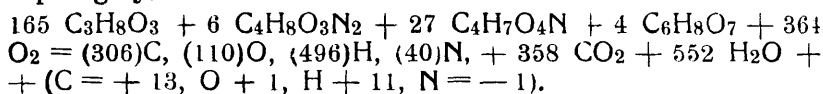
d) Przemiana wodna. Z pozostałych ilości wodoru i tlenu obliczamy ilość powstałej wody. Ilość wody obliczonej z wodoru wynosi 989,1 mg, obliczonej z tlenu = 989,1. Wielkości te są bardzo zbliżone do siebie. Przyjmijmy że średnio wydzieliło się 993,6 mg wody.

e) Przemiana gazowa. Iloraz oddechowy wynosi 0,983. Ilość odłożonego węgla w prątkach (367,6 mg) jest mniejsza od $\text{Cco}_2 = 429,7$.

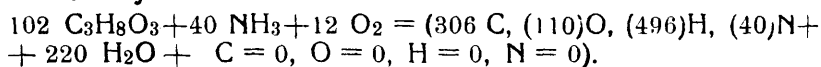
f) Równania względne. Skład pierwiastkowy prątków szczepu H5 podany w % po odliczeniu popiołu (zawartość popiołu wynosiła 4,28%) jest następujący: C = 56,55%, O = 27,14%, H = 7,63%, N = 8,68%.

Na podstawie danych z tablicy V stworzono wzór względny dla szczepu H5: (306)C, (110)O, (496)H, (40)N. Z tego wzoru obliczamy I. S. prątków wynosi 0,887. Jest on nieco wyższy od I. S. szczepu H3 i z tego powodu glicerol staje się tu podilorazowym związkiem.

Z danych doświadczalnych drugiego doświadczenia zestawionych na tablicy V ułożono przybliżone równanie stechiometryczne, mając jak i w poprzednich rozważaniach na względzie częściowy rozkład hydrolityczny asparaginy przez asparaginazę bakteryjną, — rozkład poprzedzający pochłanianie asparaginy.

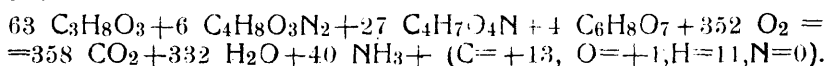


Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu rozważmy i tu dwie skrajne możliwości. Gdyby przyjęto, że tylko glicerol wraz z NNH_3 jest substratem tworzącym część organiczną ciała drobnoustrojowego to mamy następn. równanie dla jego konstrukcji:

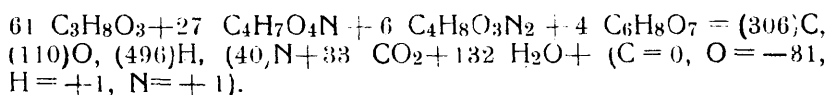


¹⁾ loc. cit.

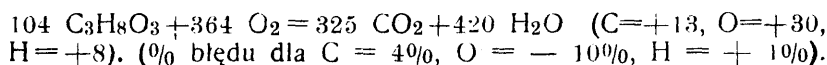
Równanie odtwarzające całkowite utlenienie pozostałej reszty organicznej z wytworzeniem NH_3 przedstawia się następująco:



Dla drugiej skrajnej ewentualności t. zn. przy zużyciu wszystkich związków nadilorazowych do konstrukcji drobnoustroju mamy następujące równanie:



Dla spalenia całkowitego pozostałej reszty glicerolu mamy:



Błędy są dlatego takie duże, ponieważ skomasowały się w tym równaniu.

Równania przedstawiające dwie ewentualności konstrukcji ciała prątków dają nam możność wyprowadzenia podobnych wniosków jak w poprzednim doświadczeniu. W przyjętej drugiej ewentualności 60% glicerolu bierze udział w budowie prątków. Również i tu spotykamy wydzielanie dużej ilości wody. Przy pierwszym założeniu 36% całkowicie wydzielonej wody pochodzi z dehydratacji biosyntetycznej (397 mg H_2O t. zn. 58% na utworzoną suchą masę bakteryjną). Na 1 cząsteczkę glicerolu powstaje nieco więcej niż 2 cząsteczki wody. — W drugim skrajnym przypadku ilość wydzielonej wody z dehydratacji biosyntetycznej wynosi 24% całkow. wydz. H_2O (poprzednio 28%). Na suchą masę bakteryjną wynosi to 35%.

Zestawienie wyników otrzymanych z doświadczeń wykonanych na szczepach ludzkich H3 i H5.

1). Szczepy ludzkie nie wytwarzają w okresie rozwoju na pożywce NK takich ilości ciał organicznych, aby mogły one zaważyć na ogólnym i organicznym bilansie materialnym. Szczepy te są więc doskonałymi utleniaczami substratów w stosowanych warunkach. Nie fermentują, lecz całkowicie spalają podane substraty (glicerol, asparaginę i kwas cytrynowy) aż do ostatecznych produktów

t. j. do CO_2 i H_2O . Twierdzenie to jest ograniczone stosowanymi metodami. Czy dany proces należy zaliczyć do fermentacji czy do procesu całkowitego utlenienia substratów, zależy od umowy. Jednakże porównując metabolizm prątków z metabolizmem typowych ustrojów fermentujących jak np. z *B. coli*, uwydatniają się wybitnie ich różnice.

2). Oprócz amoniaku żadne inne związki azotowe nie zostają przez badane szczepy ludzkie wydzielone do podłoża. Powstały amoniak pochodzi przede wszystkim z bakteryjnej dezamidacji asparaginy. Prawdopodobnie enzym asparaginaza jest związana ze strukturą komórki. Proces dezamidacji zachodzi tu na dużą skalę. Prątki pochłaniają znacznie więcej azotu pochodzenia aminowego niż amidowego względnie amoniaku pochodzenia amidowego. Z oznaczonych ilości grup aminowych, amidowych, amoniaku i azotu całkowitego da się obliczyć jaka ilość asparaginy i kwasu asparaginowego zostały wchłonięte przez bakterie. Jednak za pomocą naszych metod nie daje się rozstrzygnąć czy te związki ulegają resorpcji w całości, czy też przed wchłonięciem nastąpił najpierw rozpad hydrolityczny grup amidowych wzgl. aminowych, a po tym dopiero wchłonięcie utworzonego amoniaku z powstałą resztą po dezamidacji (wzgl. dezaminacji). Wszystko przemawia za tem, że dezaminacja nie następuje w środowisku.

3). PH podłoża, które na początku wynosi 7,2, ulega bardzo małemu zalkalizowaniu, dzięki utworzeniu się amoniaku. W dośw. 1. PH końcowe = 7,5, w drugim = 7,4 (oznaczono kolorymetrycznie). Powstały amoniak wiąże spore ilości wywiązanego dwutlenku węgla, dlatego też zawartość kwasu węglowego w podłożu po rozwoju prątków jest znaczna.

4). Iloraz spaleniowy prątków jest bardzo niski, dla $\text{H}_3=0,857$, dla $\text{H}_5=0,887$ (dla porównania podajemy I. S. pleśniaków, który jest bliski jedności). Te małe liczby, pochodzą od dużej zawartości ciał tłuszczowych w prątkach (wysoki stopień redukcji).

5). Iloraz oddechowy w pierwszym dośw. wynosi 0,955, w drugim 0,983. I. S. glicerolu = 0,857, I. S. asparaginy i kwasu cytrynowego = 1,333. I. O. jest większy od I. S. glicerolu a mniejszy od I. S. substratów nadilorazowych. Robiono próby zbadania przemiany budulcowej na podstawie przemiany gazowej. Stwierdzono jednak, że za pomocą danych z przemiany gazowej nie da się rozstrzygnąć zagadnienie udziału poszczególnych związków organicznych szczególnie węgla tych związków w budowie prątków.

6). Na zasadzie naszej metody udało się pierwszy raz uchwycić ogólną przemianę wodną drobnoustrojów w sposób bilansowy, przy czym można w przybliżeniu ocenić jaka ilość wody wydzielila się z powodu całkowitego spalania substratów (woda spaleniowa), a jaka ilość pochodzi z dehydratacji biosyntetycznej. Z danych obu doświadczeń można w przybliżeniu powiedzieć, że po pierwsze ilość całkowicie wydalonej wody jest 1 i pół razy większa (150%) niż ilość powstałej masy bakteryjnej (bez wliczenia popiołu), po drugie, że większa część tej wody stanowi wodę spaleniową bo około 110% masy prątków, gdy tymczasem reszta 40% przypada na wodę powstałą z dehydratacji biosyntetycznej. Ścisłej w pierwszym doświadczeniu trzeba przyjąć, że 42,3%, w drugim 39,0% masy bakteryjnej przypada na tę wodę.

7). Z równań chemicznych odzwierciadlających proces budowy masy prątkowej ze substratów wynika, że na 1 cząsteczkę pobranego glicerolu wydają się w przybliżeniu 2 cząsteczki wody.

8). Udział węgla substratów w budowie prątka jest tego rodzaju, że w pierwszym doświadczeniu najmniej $\frac{3}{4}$ węgla drobnoustrojowego pochodzi od wchłoniętego glicerolu, w drugim najmniej $\frac{2}{3}$. Widzimy z tego, że węgiel glicerolu musi mieć przeważający udział w budowie ciała prątkowego.

9). Ponieważ jedynym źródłem azotu jest asparagina, to azot prątkowy musi pochodzić tylko z tego związku.

Doświadczenie 3.

Przemiana materii szczepu 801 typu bydlęcego hodowanego na pożywcę Santona.

a) Ogólne dane. Szczep ten otrzymany od prof. Karwackiego wyróżniał się od innych nawet tego samego typu tym, że rósł na podłożu Sautona w obecności czystego tlenu. W doświadczeniu 3 prątki hodowano w czystym tlenie na 100 ml pożywki Sautona w kolbie o pojemności 1 litra. Po 24-dniowej hodowli w temp. 34° wykonano analizy składników pożywki i analizy gazowe równoległe z analizami zawartości kolby kontrolnej. Wyniki tych badań są podane na tablicy VI.

b) Przemiana węglowa. Równanie bilansowe przeznaczone dla węgla organicznego katabolitów, daje następujący wynik:

$$(1) \approx C^u \text{ org.} = \approx C^I - C^m - C^{CO_2}. 1384,6 - 340,5 - 1004 = +40,1.$$

Tablica VI.
Doświadczenie 3. Bilans pierwiastkowy organiczny dla szczepu 801 prątka typu bydłęcego hodowanego na pożywe Sautona w mg (przeliczony na 100 ml pożywki).

Związki pobrane ze środowiska	Ubytek w %	C	O	H	N	Masa pobranych i wydalonych związków
Glicerol	54,0	1272,0	1696,0	282,7		3250,7
Asparagina bezw.	67,0	97,6	97,6	16,5	57,1 gr amin = amid.	268,8
Kw. cytryn, bezw.	20,0	15,0	23,4	1,7		40,1
Amoniak				0,8	3,7	4,5
Tlen			3116,0			
Suma pierwiastków i całkowita masa pobranych związków		1384,6	4933,0	301,7	60,8	6680,1
Skład pierwiastkowy bakterii (bez popiołu)		340,5	196,9	39,9	55,7	632,0
Różnica. Wydzielona ilość		1044,1	4736,1	261,8	5,1	6048,1
Ubytek całkowitych C i N z pożywki		1402,0			59,3	
Związki wydalone	Ilość C i O w CO ₂ (gaz + pożywka)	1004,0	2677,0			3681
	Ilość pozost. O i H i publicznego H ₂ O		2059,1	261,8		2336 średnio

Wynik ten wskazuje na to, że ilości wydzielonych związków organicznych podczas rozwoju muszą być bardzo małe w stosunku do całkowitej przemiany węglowej. Wynosi to około 2,9% ogólnej przemiany. Liczba ta jest już na granicy błędu doświadczalnego. Dla kontroli analiz zastosujemy równanie określające ubytek węgla organicznego w roztworze w obecności rozwoju prątków.

$$(2) \Delta C \text{ org. mokr. met.} = \approx C^I - \approx C^{II} \text{ org.} = C_m + C_{CO_2} \\ 1384,6 - 40,1 = C_m + C_{CO_2} = 1344,5 \text{ mg C org.}$$

Doświadczalnie otrzymano 1402,0 mg C organ. W 3-cim doświadczeniu jak widzimy nie osiągnięto tego stopnia zgodności w powyższych liczbach jak w poprzednich.

c) Przemiana azotowa. Ubytek azotu całkowitego z pożywki wynosi 59,3 mg. W prątkach znaleziono 55,7 mg. W celu wykazania ilości wydzielonego azotu pod postacią związków organicznych podstawimy w równaniu II odpowiednie liczby:

$$(II) \approx N^{II} \text{ org.} = \approx N^I - \Delta \approx N = 60,8 - 59,3 = +1,5 \text{ mg N} \\ \text{Gdy wstawimy zamiast } \Delta \approx N, N_m, \text{ otrzymamy } 60,8 - 55,7 = +5,1 \text{ mg N.}$$

Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach ilości $C^{II} \text{ org}$ i $N^{II} \text{ org.}$ są naszą metodą trudne do stwierdzenia, ponieważ znajdują się one blisko dopuszczalnych granic błędu doświadczalnego. W równaniu (II) nie podano ilości wydalonego amoniaku, ponieważ z wartości NH_3 jednego z głównych składników azotowych pożywki Sautona prawie nie uległa zmianie.

d) Przemiana wodna. Ilość wydzielonych O i H po odliczeniu części tlenu związanego w CO_2 wynoszą 2059,1 mg O i 261,8 mg H. Stosunek tych liczb ma się do siebie jak 7,9:1 t. zn. jest bardzo zbliżony do tego stosunku w wodzie. Z obliczenia wartości średniej mamy następ. ilość wydalonej wody = 2336 mg H_2O .

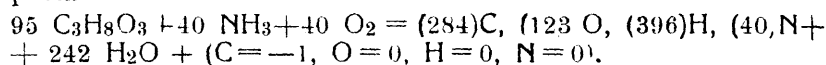
e) Przemiana gazowa. Iloraz oddechowy wynosi 0,860. C_{CO_2} jest prawie 3 razy większy od C_m .

f) Równania względne przemiany organicznej. Skład pierwiastkowy prątków typu bydłowego jest następujący: C = 53,78%, O = 31,10%, H = 6,30%, N = 8,82%. Porównując ten skład ze składem typów ludzkich widzimy pewne różnice w zawartości tlenu i wodoru. Zawartość popiołu wynosiła 3,2%.

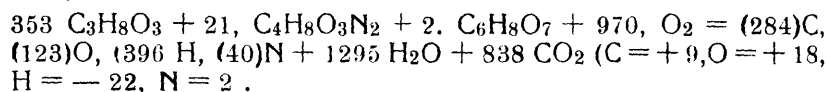
Dla szczepu 801 wzór względny, otrzymany na zasadzie danych tablicy VI jest następujący: (284)C, (123)O, (396)H,

(40)N. Z tego wzoru obliczony I. S. drobnoustroju równa się 0,974, jest więc wysoki w porównaniu do ilorazów spaleniowych prątków typu ludzkiego. Glicerol jest tu związkiem podilorazowym, a asparagina i kw. cytrynowy nadilorazowym. Ilości pobranego kwasu cytrynowego są tu bardzo małe. Oprócz tego nie stwierdzono tu działania hydrolitycznego na asparaginę. Tak, że ilości pobranych grup amidowych równają się ilościom pobranych grup aminowych = N amin = N amid.

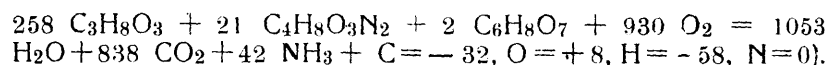
Rozważmy pierwszy możliwy skrajny przypadek mianowicie, że cały glicerol przechodzi wraz z NH_3 w skład drobnoustroju, a związki nadilorazowe razem z pozostałą resztą glicerolu ulegają całkowitemu utlenieniu. Równanie oddające proces budowy ustroju przybiera w tym przypadku następującą postać:



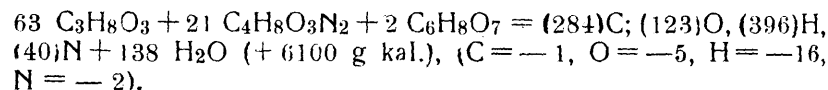
Równanie stechiometryczne dla całej przemiany organicznej przedstawia się następująco:



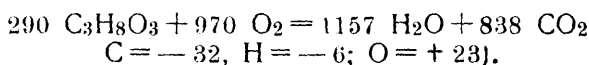
Równanie odzwierciadlające oddychanie przy pierwszym założeniu:



Równanie odtwarzające przemianę substratów nadilorazowych wraz z odpowiednią ilością glicerolu w ciało bakteryjne wygląda następująco:



W tym przypadku wzór sumaryczny pobranych substratów (285)C, (688)H, (266)O, (42)N, daje I. S. = 0,974, czyli jest to zbiór substratów równoilorazowych z drobnoustrojem. Równanie dla procesu oddychania w drugim założeniu:



Na podstawie podanych równań stechiometrycznych, które stanowią skrajne możliwości w tworzeniu się ciała organicz-

nego prątków, można wyciągnąć następujące wnioski: 1) Najmniej 68% węgla prątków pochodzi z glicerolu. 2) Ilość wody wyzwolonej z powodu dehydratacji biosyntetycznej wynosi w pierwszym założeniu 67%, w drugim 38% w stosunku do ciężaru powstałej suchej masy prątków.

3) W pierwszym założeniu ilość cząsteczek wydzielonej wody z dehydratacji biosyntetycznej znacznie przekracza podwójną ilość zużytych cząsteczek glicerolu do budowy prętka. (Tu trzeba by uwzględnić dehydratację związaną z przyłączeniem azotu amoniakalnego przez prątki). W drugim założeniu na jedną cząsteczkę pobranego glicerolu zostają odszczepione dwie cząsteczki wody. 4) Ilość wody wydzielonej przez całkowite utlenienie substratów jest bardzo wielka w porównaniu z tymi ilościami wydzielonymi przez szczepy ludzkie. Dlatego procentowa ilość wydzielonej wody z powodu biosyntezy wynosi w pierwszym założeniu tylko 16,5% całkowicie wydzielonej wody, w drugim 10,7%.

Zestawienie wyników otrzymanych w doświadczeniach nad metabolizmem prątków typu bydłęcego (801).

1). Podobnie jak zbadane szczepy ludzkie, szczep ten (hodowany na podłożu Sautona w obecności czystego tlenu, a więc w warunkach odmiennych niż poprzednie) nie wytwarza ciał organicznych w ilościach mogących mieć większy wpływ na ogólny bilans materialny. Jest to również drobnoustroj nie fermentujący w stworzonych przez nas warunkach.

2). Ilość pochłoniętych przez prątki grup aminowych równa się ilości pochłoniętych grup amidowych. Czy jest to cechą danego typu czy też ma łączność z hodowaniem na innym podłożu niż typy ludzkie, nie da się rozstrzygnąć z danych doświadczalnych. Ilość pobranego amoniaku z pożywki jest stosunkowo bardzo mała.

3). Iloraz spaleniowy prątków 801 jest w porównaniu z I. S. typów ludzkich wysoki. I. S. = 0,974. Wskazywałoby to na mniejszą zawartość ciał tłuszczowych w drobnoustroju.

4). Gdyby się przyjęło maksymalny udział substratów nadilorazowych (przede wszystkim asparaginy) w budowie ciała prątków, wtedy wypadkowy I. S. sumy substratów, t. zn.

glicerolu + asparaginy, biorących udział w budowie ciała byłby równy I. S. prątków. W tym przypadku I. O. musiałby być równy I. S. glicerolu t. zn. = 0,857. — I. O. znaleziony wynosi 0,860, jest więc bardziej zbliżony do wywnioskowanego a zarazem znacznie niższy od I. O. prątków typu ludzkiego.

Mimo, że te liczby są bardzo zbliżone do siebie, jednak za pomocą danych o przemianie gazowej (tak jak poprzednio) nie da się rozstrzygnąć o udziale poszczególnych substratów w budowie ciała prątkowego. Gdy bowiem przyjmiemy drugą skrajną możliwość t. j. całkowite spalanie substratów nadilorazowych i udział jedynie glicerolu w budowie ciała to I. O. powinien wynosić 0,877, a więc jest to rezultat nie wiele odbiegający od poprzedniego.

5). Ilość całkowicie wydzielonej wody jest w tym wypadku bardzo duża. Wynosi ona 370% masy utworzonych bakterii (bez popiołu), w czym wody spaleniowej jest w pierwszym skrajnym przypadku około 330% masy drobn. w drugim zaś około 320% masy. — Duża ilość powstałej wody spaleniowej jako też i duża wymiana gazowa, duże ilości pochłoniętego tlenu i wydalonego bezwodnika węglowego, w porównaniu do odpowiednich danych z dośw. 1 i 2, wskazują na około dwa razy większe nasilenie procesów utlenienia całkowitego (oddychania). W tym wypadku nie wiadomo czy te różnice w metabolizmie są spowodowane przeszło podwójnie większym stężeniem tlenu, czy też jest to cecha swista danego szczepu.

6). Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach tak i tutaj na 1 cząsteczkę glicerolu pobranego do budowy ustroju przypadają 2 cząsteczki wody dehydratacyjnej.

7). Udział węgla glicerolowego w budowie prątka w pierwszej skrajnej ewentualności (t. zn. przy maksymalnym udziale węgla substratów nadilorazowych) wynosi 68%. Jest to najmniejsza możliwa liczba, która jest tego samego rzędu co w dośw. drugim.

8). Z zebranych danych dośw. 1, 2 i 3 wynika, że węgiel glicerolowy bierze w przeważającej ilości udział w budowie ciała prątkowego i w procesie oddychania. Glicerol zużyty do budowy prątka musi ulec w trakcie procesu budowy silnej dehydratacji. Dehydratacja jest tego stopnia, że można przypuszczać istnienie akroleiny jako związku pośredniego w przemianie budulcowej. — Dane te wskazują drogę do badań metabolizmu pośredniego.

Doświadczenie 4.

Ogólna przemiana organiczna szczepu B. C. G. hodowanego na pożywce NK.

a) Ogólne dane. Prątki szczepu B. C. G. otrzymanego od Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie hodowano w kolbie o objętości 5822 ml, na 200 ml pożywki N.K. w obecności mieszaniny gazowej zawierającej 43,3% tlenu i 50,7% azotu. W temp. 18,2° ciśnienie wewnątrz kolby wynosiło 714,6 mm Hg. Był to drugi pasaż na pożywce N.K. po przesianiu z kartofla. Po 20 dniach hodowli gruby kożuch pokrywał prawie całą powierzchnię podłoża. Po poruszeniu kolby zaczął on opadać na dno. Samo podłoże było koloru jasnożółtego i łatwo pieniało się. Poprzednie podłoża pobakteryjne po szczepach H3 i H5 nie pieniały się z taką łatwością. Wyniki doświadczenia są podane na tablicy VII.

b) Przemiana węglowa. Podstawiając dane z tablicy w następ. równaniach bilansowych węgla:

(1) $\approx C^{\text{II}} \text{ org.} = \approx C^{\text{I}} - C_{\text{m}} - C_{\text{CO}_2}$ i (2) $\Delta C \text{ org. mokr. met.} = \approx C^{\text{I}} - \approx C^{\text{II}} \text{ org.} = C_{\text{m}} + C_{\text{CO}_2}$ otrzymujemy:

$\approx C^{\text{II}} \text{ org.} = 977,4 - 340,9 - 538,5 = + 98,0$ (w porównaniu ze szczepami H3 i H5 poprzednio zbadanymi mamy dla H3 = -17,6, dla H5 = -5,8 (dla szczepu 801 = +40,1). $\Delta C \text{ org. mokr. met.} = 977,4 - 98,0 = 340,9 - 538,5 = 879,4$.

Ostatnia wielkość obliczona jest zbliżona do otrzymanej doświadczalnie = 905,0, co wskazuje na nieźle wykonane analizy związków węglowych. — Wynik otrzymany na podstawie równania (2) wskazuje na to, że prątki szczepu B. C. G. w odróżnieniu od szczepów typu ludzkiego wydzielają produkty organiczne do podłoża w takich ilościach, że za pomocą naszej metody dadzą się niedwuznacznie uchwycić (około 10% ogólnej przemiany węgla. Spostrzeżenie to jest zgodne z obserwacją J. Debiess'a poczynioną na szczepie B. C. G. (loc. cit.).

c) Przemiana azotowa. Ubytek azotu całkowitego z pożywki: $\Delta \approx N = 55,0$. Ilość azotu znaleziona w prątkach wynosi: $N_{\text{m}} = 55,9$. Podstawione równanie bilansowe przeznaczone do określenia produktów organicznych azotowych przedstawia się następująco:

$\text{II} \approx N^{\text{II}} \text{ org.} = \approx N^{\text{I}} - \Delta \approx N \text{ (lub } N_{\text{m}}) - N_{\text{NH}_3} = 135,8 - 55,0 - 75,2 = + 5,6$ (dla H3 = + 1,5 dla H5 = + 0,5).

Ilość znalezionego $\approx N^{\text{II}} \text{ org.}$ przekracza już zakres błędu

T a b l i c a V I I .
Bilans pierwiastkowy organiczny dla szczepu B. C. G. hodowanego na pożywce N. K. w mg (przeliczony na 100 ml pożywki).

Związki pobrane ze środowiska	Ubytek w %	C	O	H	N	Masa pobranych i wydzielonych związków
Glicerol	41,7	733,6	978,2	164,3		1876
Asparagina	85,2	217,8	217,8	36,6	N amin 63,5 N amid 72,3	599,4 bezw.
Popr. na kw. asp.			+ 72,6	— 4,5		
Kwas cytrynowy	37,9	26,0	40,5	2,9		759
Tlen	99,2		1486,0			
Suma pierwiastków i całkowita masa pobranych związków		977,4	2795,1	199,3	135,8	
Skład pierwiastkowy baterii (bez popiołu)		340,9	177,7	47,1	55,9	621,8
Różnica. Wydzielona ilość pierwiastków		636,5	2617,4	152,2	80,1	
Ubytek całkowitego C i N z pożywki		905,0			55,0	
Ilość C i O w CO ₂ (gaz i pożywka)		538,5	1436,1			1974,6
Ilość pozostałego O i H i obliczonego H ₂ O			1181,3	152,2		O/H = 7,11
Związki wydalone						
Oznaczona ilość NNH ₃					75,2	

doświadczalnego, dlatego też można powiedzieć, że wśród katabolitów znajdują się organiczne związki azotowe. Ilości zdezamidowanego azotu (72,3) i powstałego azotu amoniakalnego = 75,2 są do siebie bardzo zbliżone. Można więc przypuszczać, że prawie cała ilość amoniaku znajdującego się w roztworze jest pochodzenia amidowego, tylko minimalna część może pochodzić od N amin (75,2 — 72,3 = 3,9).

Ponieważ ilość powstałych związków organicznych w czasie rozwoju prątków szczepu B. C. G. jest znaczną, dlatego bez określenia tych związków pod względem jakościowym i ilościowym nie będzie można oznaczyć ilości wydalonej wody. Stosunek O reszt./H reszt. równa się 7,11. — Ilość N org. jest w stosunku do ilości C org. bardzo mała.

Z danych tablicy VII obliczony iloraz oddechowy dla szczepu B. C. G. wynosi 0,967, jest więc zbliżony do otrzymanych ilorazów dla typów ludzkich I. O. H3 = 0,955, I. O. H5 = 0,983. Skład pierwiastkowy prątków B. C. G. również nie bardzo odbiega od składu typów ludzkich. Jest on następujący: C = 53,60%, O = 27,95%, H = 7,40%, N = 8,80%. Zawartość popiołu jest niższa i wynosi 2,25%. PH pożywki na początku doświadczenia = 7,2, — na końcu = 7,0. W pożywce powstały duże ilości węglanu amonowego z wydzielonego amoniaku i bezwodnika węglowego. Metodą kolorymetryczną zbadano ubytek żelaza w pożywce w czasie wzrostu szczepu. Zawartość Fe na początku wynosiła 0,68 mg na 100 ml na końcu 0,28 mg na 100 ml.

Porównyując metabolizm wzrostowy ogólny szczepu B. C. G. z metabolizmami szczepów ludzkich H3 i H5 dochodzimy do następujących wniosków:

1). Przemiana materii obliczona na g suchej masy drobnoustroju jest wybitnie większa u szczepu B. C. G. (Tablica VIII). Nie podano analogicznych danych dla typu bydłęcego 801, ponieważ był on hodowany w zupełnie innym środowisku (na podłożu Sautona i w 100% tlenu). W przybliżeniu można powiedzieć że przemiana gazowa szczepu B. C. G. przewyższa o 35% przemianę gazową u typu ludzkiego. Ubytek glicerolu u B. C. G. przewyższa o 20%, a ubytek asparaginy o przeszło 50% odpowiednie ubytki u typów ludzkich.

2). Szczep B. C. G. wydziela znacznie większe ilości amoniaku aniżeli szczepy ludzkie (ostatnia kolumna tablicy VIII). Równolegle do tego zjawiska stwierdzono prawie całkowite odszczepienie grupy amidowej

Tablica VIII.

Porównanie ogólnych metabolizmów wzrostowych szczepów H3 i H5 ze szczepem B. C. G. hodowanych na pożywce N. K. (Przemiany podano w mg na g suchej masy bakteryjnej).

Nr dośw.	Szczep	Czas hodowli	Powstała masa bakteryjna	Zużycie w mg O ₂	Powstało CO ₂	Ubytek glicerolu	Ubytek asparag bezw.	Powstało NNH ₃
1	H3	35	857,7	1736	2280	2412	582	58,4
2	H5	35	650,0	1793	2425	2331	678	71,9
4	B. C. G.	20	621,8	2390	3176	3017	964	121,0
nie podano w tekście	B. C. G.	38	671,0	2183	3045	2730	952	119,0

z pozostałej jeszcze asparaginy, tak, że przy końcu doświadczenia w obu zbadanych przypadkach szczepu B. C. G. w roztworze pozostaje odpowiednia ilość kwasu asparaginowego. Zjawisko to wskazuje na znacznie silniejsze działanie asparaginazy w przypadku szczepu B. C. G.

3). Podczas rozwoju szczepu B. C. G. wydzielają się do podłoża takie ilości ciał organicznych, że dadzą się uchwycić naszą metodą. Ciała te nie zostały przez nas bliżej zbadane. Według J. Debiessa i innych w skład tychże wchodzi kwas szczawiowy, kwas bursztynowy, kwas jabłkowy, laktoza i inne. Szczepy H3 i H5 nie wydzielają takich ilości ciał, aby można je było naszą metodą stwierdzić. Jest rzeczą możliwą, że ta cecha szczepu B. C. G. ma związek z jego zdolnościami antygenowymi.

4). Nie stwierdzono większych różnic w I. O. badanych szczepów.

Na podstawie wymienionych różnic w przemianach materii można porównać szczepy prątków z szczepami drożdży. Wiadomy jest fakt, że drożdże dzikie nie fermentują, rasowe zaś wykazują duże zdolności fermentacyjne. Metabolizm szczepu B. C. G. można porównać do przemiany materii drożdży rasowych, natomiast metabolizm prątków zjadliwych do przemiany drożdży dzikich. Tak w przypadku drożdży jak i prątków długotrwała hodowla wytworzyła zdolności fermentacyjne u tych drobnoustrojów.

B. Metabolizm ogólny głodzonych prątków.

Przemiana materii prątków gruźliczych w głodzie w obecności tlenu i soli mineralnych.

Badania nad przemianą głodową mają podstawowe znaczenie. Najgłówniejszym bodaj znaczeniem tych badań jest to, że na ich podstawie można wytworzyć masę bakteryjną pozbawioną rezerw odżywczych do tego stopnia, że tworzy materiał ustrojowy pod wieloma względami ustabilizowany, a tym samym nadający się do innych badań metabolicznych. Po pewnym czasie głodzenia można osiągnąć taki stan ustroju, w którym nie zachodzą większe wahania w procesie oddychania i w składzie drobnoustrojów.

Niestety dotychczasowe nasze badania metabolizmu prątków w głodzie nie dały zadowalających rezultatów w dziedzinie przemiany węglowej. W żadnym doświadczeniu nie otrzymano zgodnych pokrywających się ze sobą liczb, na pod-

stawie których możnaby było stworzyć równanie bilansowe dotyczące węgla, jak to miało miejsce w poprzednich doświadczeniach. Natomiast przemiana azotowa i gazowa dawały się dobrze uchwycić równaniami. Przypuszczalne przyczyny tych niezgodności podamy niżej. Mimo, że dotychczas sprawa ta nie została całkowicie wyjaśniona podamy wyniki jednego z doświadczeń (Tabl. IX) a to w tym celu, aby móc się zorientować z jakiego rzędu wielkościami mamy, do czynienia w takich badaniach, oraz w celu wykazania bilansu azotowego i przemiany gazowej. W oddzielnej tablicy (Tabl. X) zestawiliśmy dane z innych doświadczeń, dotyczących przede wszystkim przemiany azotowej, gazowej i ubytku ciężaru prątków w czasie głodzenia. Opis i wyniki doświadczenia (Tabl. IX).

Prątki szczepu H5 wyhodowano na 200 ml pożywki N. K. (pasaż 9) w ciągu 36 dni. Po usunięciu podłoża, które zanalizowano na zawartość azotu całkowitego, przemyto kożuch bakteryjny dwukrotnie, za każdym razem używając 200 ml roztworu wodnego zawierającego 0,05% K_2HPO_4 i 0,05% $MgSO_4$. Z trzeciej podwarstwionej porcji roztworu (300 ml) ściągnięto około 135 ml płynu do analiz wyjściowych. Resztę roztworu pozostawiono w kontakcie z kożuchem w kolbie. Kolbę doświadczalną o zawartości 5809 ml napełniono mieszaniną gazową, składającą się z 36,2% O_2 i z reszty stanowiącej azot. Objętość podłoża wynosiła 167,5 ml. Po 43 dniach pobytu kolby z prątkami w termostacie w temp. 37° wykonano analizy gazu, płynu i samych prątków. Równolegle w tych samych warunkach, prowadzona druga hodowla tego szczepu (aż do czasu podwarstwiania) została zanalizowana na skład pierwiastkowy i na zawartość popiołu. Podajemy wyniki analiz prątków. Skład pierwiastkowy prątków przed głodzeniem (z hodowli 2): C = 53,36%, O = 26,64%, H = 7,85%, N = 8,26%, popiół = 3,89%. Skład pierwiastkowy prątków po głodzeniu (hodowla 1): C = 53,01%, O = 26,95%, H = 8,49%, N = 8,84%, popiół = 2,71%.

Z oznaczonych ilości węgla organicznego w podłożu (Tabl. IX) wynika, że ilość związków organicznych, które przedostały się z prątków do podłoża jest bardzo mała mimo długotrwałego głodzenia (43 dni), bo wynosi wszystkiego $\Delta C_{organ.} = 6,2$ mg, — to wyklucza możliwość procesu autolizy. Ubytek węgla z prątków (199,4 mg) podczas głodzenia jest za mały, w porównaniu do przyrostu węgla w środowisku, który równa się $225,3 + 6,2 = 231,5$. Najprawdopodobniej niezgodność ta pochodzi stąd, że z przestrzeni międzykomórkowej kożucha nie dają się usunąć całkowicie resztki

pożywki przez wymywanie. Tą pozostałością po pożywce drobnoustrój prawdopodobnie oddycha intensywnie w pierwszych dniach naszych doświadczeń.

Obok tej najwięcej prawdopodobnej przyczyny możnaby się domyślać i innych, np. powodem tego stanu rzeczy może być lotność pewnych substancji zawartych w głodzonych prątkach: długie suszenie może spowodować ich ulatnianie się, co obniżyłoby ciężar prątków. Drugą możliwą przyczyną jest adsorbcja substratów lub produktów na powierzchni prątków. Podczas przemywania prątków na sączku przed zanalizowaniem ich, mogłaby nastąpić elucja tych substancji. Najczęściej zanalizowana ilość węgla wydalonego do środowiska jest większa, od ubytku węgla z prątków. Natomiast stwierdzono, że w późniejszych okresach głodu ma się rzecz wręcz przeciwnie — oznaczona ilość węgla wydalonego z prątków jest większa, od wzrostu ilości węgla w środowisku. Wszystkie te niezgodności nie są jeszcze wyjaśnione i wymagają dalszego badania.

Zupełnie zgodne wyniki otrzymano w bilansie azotowym. Podstawiając w równaniach bilansowych przeznaczonych dla przemiany azotowej dane z tablicy IX mamy:

$$(I) \Delta \approx N = \approx N^I - \approx N^{II} = \Delta Nm, 24,6 = 24,5. (II) \approx N^{II} \text{ organ.} = \approx N^I - \Delta \approx N - N_{NH_3}, 24,6 - 19,1 = 5,5 \text{ mg.}$$

Jest to zarazem ilość azotu organicznego nie rozpoznana. W bilansie uwidacznia się stosunkowo duża ilość wydalonego amoniaku. Porównując wydany azot organiczny z wydany węglem organ. dochodzimy do wniosku, że powstała stosunkowo wielka ilość azotu organicznego.

Pozostałe ilości tlenu (214,1) i wodoru (17,7) mogą wchodzić w skład nie tylko wydalonej wody, lecz również w skład substancji organicznych wydanych do podłoża. Uderzająca jest duża ilość pozostałego tlenu (O reszt.). Można by przypuszczać, że wydzielone substancje organiczne są bardzo utlenione.

Na tablicy XI i na ryc. 7 jest podany przebieg przemiany gazowej w czasie głodzenia prątków. Jak widać z krzywych tlenowych (O_{O_2} i O_{CO_2}) oddychanie endogeniczne jest bardzo intensywne do czwartego dnia głodzenia. Od piątego dnia oddychanie to ustala się i będąc stosunkowo mało intensywne, trwa aż do 43-ego dnia głodzenia. Prof. dr. Z. Skibiński stwierdził, że przez cały ten czas prątki typu ludzkiego zachowują swą żywotność. Ilorazy oddechowe w całym okresie głodzenia są niskie (Tabl. XI).

Z ostatniego doświadczenia osiągamy ważne wskazówki jak należy otrzymać materiał bakteryjny nadający się do badań przemiany materii. Chodzi tu mianowicie o badanie przemiany materii już wyhodowanych większych mas bakteryjnych w warunkach niezawsze dla nich korzystnych, w których często rozwój ich jest zupełnie zahamowany. Zauważono, że po pięciodniowym głodzeniu oddychanie endogeniczne nie ma większego wpływu na metabolizmy mas bakteryjnych w obecności substratów, które nie tworzą podłoża rozwojowego (nie wystarczają do wywołania rozwoju). Początkowe nasze badania wykonane na masach bakteryjnych, które nie przeszły okresu 5-ciodniowego postu, były zakłócone silnym oddychaniem endogenicznym, dlatego też trudno było wyciągnąć z tych badań konkretne wnioski o przemianie podanych substratów.

Na podstawie danych z tablic IX i X można zestawić następujące wyniki doświadczeń, które wybitnie charakteryzują proces przemiany głodowej prątków. Wyniki te otrzymuje się niezależnie od poprzednio wymienionych niedociągnięć w badaniach przemiany węglowej.

1. Wzrastający spadek ciężaru suchych prątków w miarę trwania głodzenia (kolumna 1 i 5 tabl. X).

2. Wyraźny wzrost procentowej zawartości azotu w prątkach głodzonych (kolumna 6 i 7 tabl. X). Procentowa zawartość węgla, tlenu, wodoru i popiołu, ulega tylko małym i nieregularnym zmianom podczas głodzenia.

3. Wydalanie bardzo małych ilości węgla organicznego i azotu organ. mimo długotrwałego głodzenia (kolumna 8 i 9 tabl. X). Z tego można wnioskować, że podczas 43-dniowego głodzenia nie zachodzi proces autolizy prątków.

4. Wydalanie stosunkowo sporych ilości amoniaku (kolumna 10 tabl. X).

5. Niski iloraz oddechowy wskazuje na przeważające spalanie ciał tłuszczowych (kolumna 12 tabl. X).

6. W pierwszych dniach głodzenia do piątego dnia oddychanie endogeniczne jest znaczne. Po piątym dniu ustala się i jest małe.

Oprócz tego należy zaznaczyć, że zmiany PH podłoża w czasie głodzenia są małe i nieregularne. Również nie ma wybitnych różnic w ilorazie spaleniowym przed i po głodzeniu.

Tablica IX.
Bilans pierwiastkowy organiczny szczepu H5 po 43 dniach głodzenia, wyrażony w mg przeliczonych na 100 ml podłoża.

	C	O	H	N	Masa pobranych i wydziel. związków
Pobrana ilość tlenu		720,0			
Masa i skład pierwiastkowy prątków przed głodzeniem	732,7	366,0	107,2	113,4	1320 bez popiołu
Masa i skład pierwiastkowy prątków po głodzeniu	533,3	271,1	85,4	88,9	979 bez popiołu
R ó ż n i c a	199,4	94,9	21,8	24,5	341
Przybyło w podłożu C organ w N całkowitym	6,2			24,6	
Ilość C i O w CO ₂	225,3	600,8			826,1
Przybyło azotu amoniakalnego				19,1	
Pozostałe ilości O i H		214,1	17,7		

C. Ogólna przemiana organiczna prątków gruzliczych wobec jednego związku organicznego.

Doświadczenie 1.

Ogólna przemiana organiczna prątków gruzliczych wobec glicerolu, jako jedyne go źródła węgla przy braku związków azotowych.

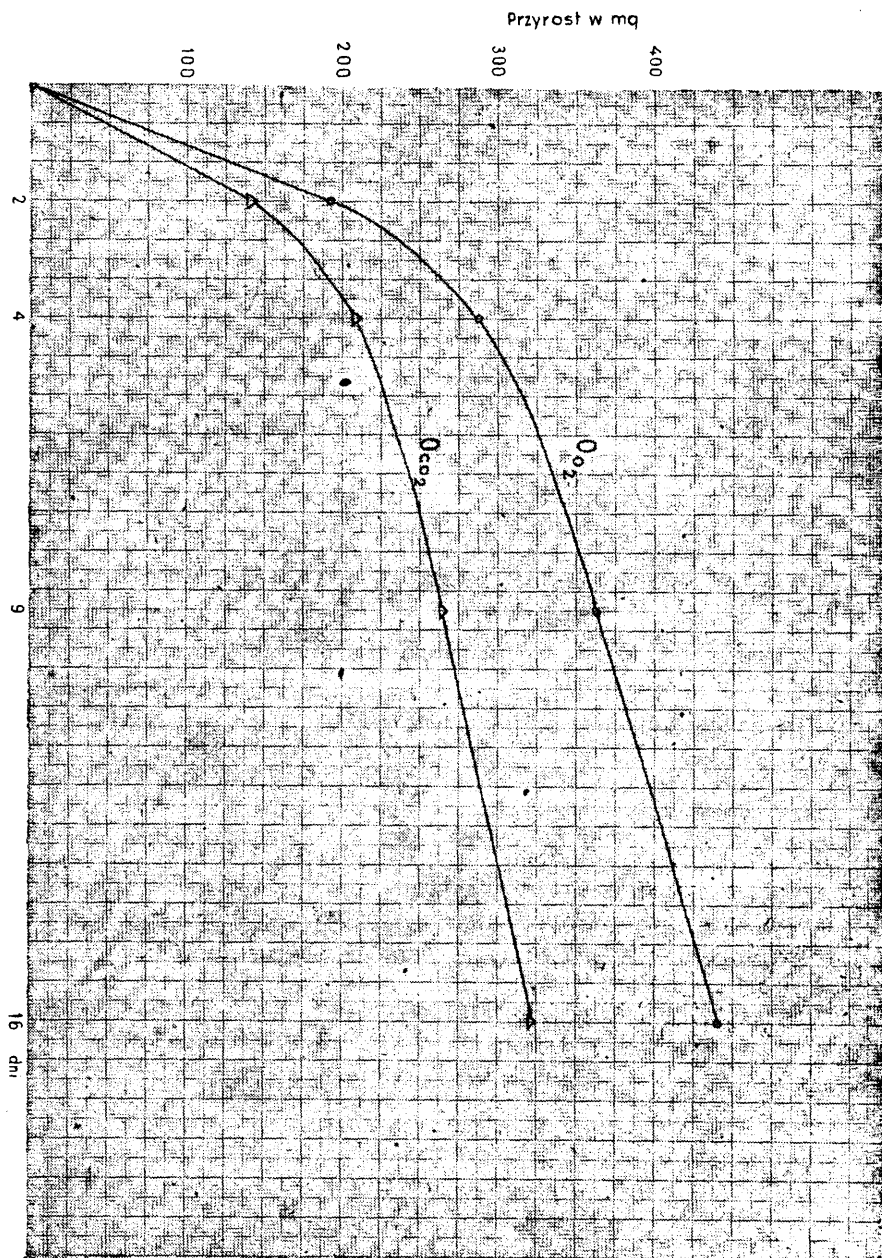
Z doświadczeń 1, 2, 3 i 4 wynika bezsprzecznie, że glicerol odgrywa wielką rolę w metabolizmie prątków tak w procesie oddychania jak i w konstrukcji ciała prątkowego. Dlatego też było rzeczą dużej wagi stwierdzić, jakim przemianom będzie podlegał glicerol pod wpływem prątków w nieobecności innych ciał organicznych i związków azotowych.

Najpierw opiszemy szczegółowo jedno z doświadczeń (Tabela XII), a następnie podamy porównawcze zestawienie najważniejszych danych otrzymanych z szeregu innych doświadczeń wykonanych z różnymi szczepami w różnym czasie (Tabela XIII).

a) Ogólne dane. W kolbie o pojemności 5794,7 ml na 200 ml pożywki N. K. (pasaż 9) wyhodowano prątki szczepu H5 w ciągu 49 dni. Ilość powstałych suchych prątków obliczona z ubytku azotu w podłożu (tak w kolbie doświadczalnej jak i w kontroli) wynosiła 1,102 g. Po usunięciu podłoża, na którym wyrósł kożuch podwarstwiono hodowlę dwukrotnie po 200 ml jałowym roztworem 0,05% K_2HPO_4 i 0,05% $MgSO_4$. Trzecią taką samą porcję pozostawiono w styczności z hodowlą na przeciąg 5 dni w temp. 37° w celu pozbycia się intensywnego oddychania endogenicznego. Następnie podwarstwiono hodowlę roztworem wodnym zawierającym 1,5% glicerolu, 0,05% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4$. Z trzeciej podwarstwionej porcji (około 300 ml) tego roztworu ściągnięto 150 ml do wykonania analiz wyjściowych.

Kolbę z podwarstwowionymi prątkami napełniono mieszkanką gazową zawierającą 44,0% O_2 (56% N_2) i wstawiono do termostatu. Objętość fazy wodnej wynosiła 151,8 ml. Po 20 dniach pobytu kolby z zawartością w termostacie w temp. 37° wykonano analizy gazu, płynu i prątków. Druga hodowla kontrolna szczepu H5 była prowadzona równolegle z doświadczalną aż do czasu podwarstwiania roztworem glicerolu. Z analizy pierwiastkowej i z oznaczenia zawartości popiołu drugiej hodowli kontrolnej wnioskowano o zmianach w składzie

Rycina 7.
Przebieg wymiany gazowej w czasie głodzenia.



pierwiastkowym hodowli doświadczalnej. Wyniki tych analiz są następujące:

Skład pierwiastkowy hodowli kontrolnej i doświadczalnej:
hodowla kontrolna:

C = 50,97%, O = 29,30%, H = 7,65%, N = 8,21%, popiół = 3,97%

hodowla doświadczalna:

C = 52,98%, O = 25,37%, H = 7,50%, N = 7,39%, popiół = 6,77%.

b) Przemiana węglowa: Na podstawie danych tablicy XII można ułożyć następujące równania bilansowe:

$$\approx C^{II} \text{ org.} = \approx C^I - \Delta C_m - C_{CO_2}$$

$$\approx C^{II} \text{ org.} = -1,7 = 525,5 - 65,0 - 462,2$$

$$\Delta C \text{ org, mokr. met.} = \approx C^I - \approx C^{II} \text{ org.} = \Delta C_m - C_{CO_2}$$

$$525,5 - 1,7 = 65 - 462,2 = 527,2.$$

Doświadczalnie znaleziono 525,7 co wskazuje na zgodność liczb otrzymanych drogą analityczną. Ponieważ $\approx C^{II} \text{ org.} = 1,7$ można więc wyciągnąć wniosek, że i w tych warunkach prątki typu ludzkiego praktycznie nie wytwarzają związków organicznych. Z tego dalszy wniosek, że i w tym wypadku prątki również nie ulegają autolizie.

Pierwotnie związków azotowych nie było w pożywce. Ilość powstałego azotu całkowitego w pożywce po doświadczeniu jest tak mała, że leży w granicach błędu doświadczalnego ($= +1,1 \text{ mg}$). Amoniak nie wytworzył się. Z tego wniosek, że prątki praktycznie nie wydzieliły żadnych związków azotowych.

Z różnicy w składzie pierwiastkowym prątków (tabl. X) widzimy, że tlen został wydzielony w bardzo małej ilości, natomiast wchłonięty został wodór ale również w ilościach nieznacznych.

c) Przemiana wodna. Stosunek O reszt.: H reszt. $= 7,85$ jest więc zbliżony do tegoż stosunku w wodzie. Obliczono, że średnio wydzielilo się 1007,4 mg H_2O . Jest to ilość wyliczona z danych bilansowych. Jednak masa wody obliczona na podstawie ilości wydzielonego CO_2 która powinna powstać ze spalonego glicerolu (gdyby nie było endogenicznego oddychania) wynosi 931,5. Pozostała ilość wody $1007,4 - 931,5 = 75,9 \text{ mg}$ przypadłaby na wodę powstałą z dehydratacji biosyntetycznej. Ilość wydalonej H_2O obliczona z przyswojonego C glicerolowego z uwzględnieniem straty

O = 6,5 mg i przyrostu H = 4,5 mg wynosi 89 mg (na podstawie obliczeń z wydalonego wodoru) natomiast z wydalonego tlenu = 104 mg.

Mała ilość wody wydzielonej przy biosyntezie, w stosunku do całkowitej przemiany pierwiastkowej jest przyczyną tego, że w liczbach określających masę tej wody, a otrzymanych różnymi drogami, zachodzą duże wahania. Chodzi nam tu tylko o zorientowanie się, jakiego rzędu wielkości wchodzi tu w grę.

Mimo tego stanu rzeczy można z całą stanowczością twierdzić, że z asymilacją glicerolu jest związana wybitna dehydratacja tego związku. Fakt stwierdzony

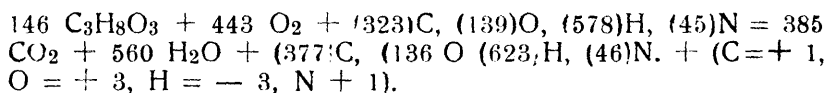
Tablica XI.

Przebieg wymiany gazowej w czasie głodzenia
Ilość prątków: 1252,4 mg (suchej masy)
Skład gazów: 40% O₂, 60% N₂.

Dzień	2	4	9	16
Przyrost w mg Oo ₂	192,1	289,2	364,1	438,1
Przyrost w mg Oco ₂	139,7	210,3	264,8	318,6
Ubytek O ₂ w mg	175,1	256,3	332,7	393,7
Iloraz oddechowy	0,798	0,821	0,796	0,809

już niejednokrotnie w poprzednich doświadczeniach, mających na celu zbadanie procesów metabolicznych w czasie rozwoju drobnoustroju.

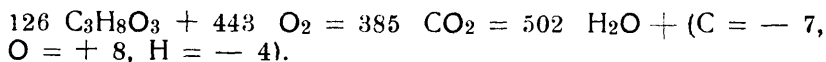
d) Równania względne. Równanie chemiczne odzwierciedlające cały proces przemiany glicerolu pod wpływem prątków ma następującą postać:



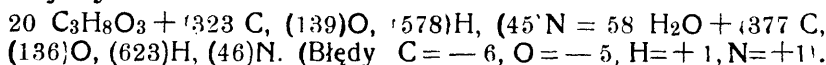
Obliczony I. S. prątków przed reakcją = 0,884

„ I. S. „ po reakcji = 0,872.

Iloraz spaleniuowy glicerolu jest trochę niższy od I. S. prątków ($=0,857$) dlatego przy przebudowie tego związku na ciało prątków powinno się związać nieco tlenu. Jednakowoż I. S. prątków spadł w czasie doświadczenia, co mogłoby być właśnie w łączności z przebudową glicerolu na ciało ustrojowe bez równoczesnego utlenienia. Wszystkie te różnice są zbyt małe, aby można było coś konkretnego w tej sprawie powiedzieć. Iloraz oddechowy w tym doświadczeniu jest zbliżony do I. S. glicerolu bo wynosi $0,871$. — Na podstawie otrzymanych i wyżej wymienionych ilorazów spaleniuowych prątków i ilorazu oddechowego możemy w przybliżeniu przyjąć, że glicerol jest równoilorazowym substratem. Przy takim założeniu łatwo jest odtworzyć proces całkowitego spalania glicerolu pod postacią następującego równania:



Odjęwszy to równanie chemiczne od poprzedniego otrzymujemy:



Według tego równania przy procesie biosyntetycznym na jedną przyswojoną cząsteczkę glicerolu zostaje odłączonych około trzech cząsteczek wody.

Waga suchych prątków bez popiołu po 20 dniach trwania doświadczenia wzrosła o $9,2\%$. Jeśli wliczymy do tego popiół, to procentowy przyrost ciężaru prątków jest znacznie większy ($=15,2\%$), ponieważ zawartość popiołu prątków w czasie doświadczenia zwiększyła się bardzo ($3,87\% \rightarrow 6,77\%$).

Ponieważ masa prątkowa zwiększyła się, a bezwzględna ilość azotu zawarta w tej masie nie uległa prawie zmianie, to z tego musi wynikać, że procentowa zawartość azotu w prątkach musi maleć. W omawianym doświadczeniu procentowa zawartość azotu spadła z $8,21\%$ na $7,39\%$.

Podłoże w czasie doświadczenia uległo słabemu zakwaszeniu. PH płynu spadło z $6,7$ na $6,1$. Warstwa wodna pod kożuchem po doświadczeniu stała się lekko opalizująca. W przesączu znaleziono prątki kwasooporne i kwasonieooporne o kształcie nieco spęczniałym. Z kożucha pobrane prątki wykazują pod mikroskopem różne formy — jakby przejściowe. Można tam znaleźć prątki kwasooporne o normalnym kształcie obok takich, które wykazują różne przejściowe stany, aż do zupeł-

nego zatracenia kwasooporności. Według orzeczenia prof. Adamskiego są to prawdopodobnie formy inwolucyjne. Jednak w kożuchu przeważają znacznie postacie normalne, gdy tymczasem w zawieszinie jest więcej form inwolucyjnych, które prawdopodobnie zatraciły zdolność zlepiania się w konglomeraty i dlatego nie będąc zdolnymi utrzymać się na powierzchni przeszły do roztworu.

Zagadnienie czy prątki równolegle ze zwiększeniem swojej masy ulegały rozmnażaniu przy czym w późniejszych generacjach tworzyły się formy inwolucyjne, czy też masa prątków powiększała się przy zachowaniu ich liczebności, nie da się na podstawie naszych dotychczasowych danych rozwiązać. Tu konieczne są określenia ilości prątków przed i po doświadczeniu.

Na podstawie danych z tablicy XII i XIII możemy wyciągnąć następujące wnioski:

1). Używając glicerolu jako jedyne go źródła węgla w warunkach tlenowych i przy nieobecności związków azotowych, natomiast przy obecności soli K_2HPO_4 i $MgSO_4$ zwiększa się masa prątków kosztem glicerolu (kolumna 3). W jednym z doświadczeń wykonanym na szczepie H3 zwiększyła się masa prątków prawie o 20% (19,7%).

2). Ze wzrostem masy prątkowej zmniejsza się odpowiednio procentowa zawartość azotu w prątkach (kolumny 4 i 5).

3). W czasie doświadczenia nie wydzielają się ani organiczne ani azotowe związki, do podłoża. Nie zachodzi więc również i proces autolizy.

4). Węgiel glicerolu bierze udział tak w tworzeniu ciała prątkowego jak i w procesie całkowitego utleniania (oddychania). Przy biosyntezie glicerol ulega daleko sięgającej dehydratacji.

5). Iloraz oddechowy w tych warunkach jest zbliżony do I. S. glicerolu (kolumna 4).

6). W tych warunkach najprawdopodobniej nie zachodzi oddychanie endogeniczne. Na to wskazują przyrost wagi i I. S.

7). Podłoże ulega słabemu zakwaszeniu.

Porównując metabolizm prątków w głodzie z metabolizmem w obecności jedyne go ciała organicznego — przy jednoczesnym głodzie azotowym dochodzimy do następujących wniosków:

1). Pod wpływem glicerolu prątki, które przeszły 5-ciodniowy okres głodowy, wykazują zupełnie odmienny metabo-

Tablica XII.
Bilans pierwiastkowy organiczny szczepu H5 w warunkach tlenowych wobec glicerolu (w mg przeliczonych na 100 ml podłoża).

Pobrane ze środowiska	Substrat	Ubytek w %	C	O	H	N	Masa pobranych i wydzielonych ciał
	Glicerol	92,5	525,5	700,7	117,7		1343,8
	Tlen	67,7		1414,4			1414,4
Suma pobranych pierwiastków i związków							
Masa i skład pierwiastkowy bakterii przed dośw.			525,5	2115,1	117,7		2758,2
Masa i skład po doświadczeniu			387,8	222,9	58,2	62,5	731,4 (bez pop.)
R ó ż n i c a			452,8	216,4	62,7	63,1	796,8 (bez pop.)
Zmiany w zawartości C organ. i N w podłożu			+ 65,0	— 6,5	+ 4,5	+ 0,6	+ 65, 4
Ilość C i O w CO ₂ (gaz i pożywka)			525,7			+ 1,1	
Ilość powstałego O i S			462,2	1232,3			1694,5
Oznaczona ilość N _{NH₃}				889,3	113,2		średnio 1007,4 H ₂ O
Związki wydalone						0,0	

Tablica XIII.

Zestawienie wyników doświadczeń wykonanych w celu zbadania metabolizmu prątków w obecności glicerolu w warunkach tlenowych i beztlenowych (w mg na 100 ml podłożu)

Szczep	Czas trwania dośw.	Przemiany w prątkach (z popiołem)					Zmiany w podłożu					Przemiana gazowa			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		Ciężar początkowy	Przyrost ciężaru	% przyrostu ciężaru	N % przed doświadczeniem	N % po doświadczeniu	Objętość podłoża	% glicerolu początk.	Ubytek glicerolu w %	N całkowity i NNH_3 po doświadczeniu	pH przed i po doświadczeniu	Objętość w ml	Zawartość O_2 w %	Ubytek O_2 w %	I. O.
H5	17	1079,0	164,0	15,2	8,52	7,14	202,0	2,0	61,7	+2,9 $\text{NH}_3=\text{O}$	7,1 6,6	5593	39,23	98,8	0,861
H5	20	760,9	93,8	12,3	8,21	7,39	151,8	1,5	92,3	+0,5 $\text{HN}_3=\text{O}$	6,7 6,1	5650	44,0	67,7	0,871
H3	7	944	186	19,7	—	—	223,1	2,0	21,7	+0,8 —	7,2 6,4	5586	21,0	60,7	0,864
B. C. G.	19	821,3	25,9	3,2	8,23	7,98	208,0	1,5	36,7	+0,1 $\text{NH}_3=\text{O}$	6,7 6,2	5610	48,7	27,2	0,781

lizm niż podczas głodzenia. Zjawiska metabolizmu w niektórych przypadkach są wręcz przeciwnie.

2). W obecności glicerolu masa bakteryjna nie tylko się nie zmniejsza, lecz wydatnie wzrasta kosztem zaasymilowanego glicerolu, który przy tym ulega silnej dehydratacji.

3). Ani amoniak ani żadne inne związki azotowe nie wydzielają się z prątków w obecności glicerolu. Procesy te wydatnie występują na jaw w czasie głodzenia.

4). W czasie głodzenia zawartość N w prątkach wzrosła, gdy tymczasem w obecności glicerolu ubywa.

5). Przeciętny I. O. w głodzie wynosi średnio około 0,77 w obecności zaś glicerolu równa się około 0,86 i jest zbliżony do I. S. glicerolu 0,857.

6). Oddychanie endogeniczne jest jeśli nie całkowicie, to na pewno w dużej mierze zahamowane w obecności glicerolu.

Doświadczenie 2.

Ogólna przemiana organiczna prątków gruzliczych w warunkach tlenowych wobec glukozy, jako jedyne źródła węgla przy braku związków azotowych.

a) Ogólne dane. Prątki szczepu H5 wyhodowano w kolbie o pojemności 5828 ml na 200 ml pożywki N.K. (pasaż 12) w ciągu 25 dni. Obliczona ilość powstałych przy tym prątków (sucha masa) = 1794 mg.

Po 5-dniowym okresie głodowym kożuch podwarstwiono wodnym roztworem o następnym składzie: 2,5% glukozy, 0,5% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4$. Następnie napełniono kolbę mieszanką gazową 40,7% O_2 i 59,3% N_2 . Objętość gazu 562,5 ml. Objętość roztworu 202,5 ml. Po 19-dniowym terminie wykonano analizy gazu, płynu i prątków.

Wyniki analiz pierwiastkowych prątków kontrolnych:

C = 52,840%, O = 25,290%, H = 7,40%, N = 8,77%, popiół 5,70%;
doświadczc.:

C = 52,370%, O = 25,660%, H = 7,60%, N = 8,070%, popiół 6,30%.

Sucha masa prątków doświadczalnych po doświadczeniu:
212,3.

b) Przemiana węglowa. Na podstawie danych tablicy XIV można ułożyć równanie bilansowe dla węgla:

$$\approx C^{II} \text{ org.} = \approx C^I - \Delta C_m - C_{CO_2} = 800 - 164 - 681 = -45.$$

$$\Delta C \text{ org. mokr. met.} = \approx C^I - \approx C^{II} \text{ org.} = \Delta C_m - C_{CO_2} =$$

$$= \Delta C \text{ org. mokr. met.} = 800 + 40 = 845 = + 164 + 681 = 845.$$

Znaleziono 832. — Z tych równań wynika, że praktycznie prątki typu ludzkiego w obecności glukozy, tlenu i soli nie wytwarzają związków organicznych. Pierwotnie związków azotowych nie było w pożywce. Praktycznie prątki nie wydzielili żadnych związków azotowych. Ilość 13 mg = ΔN_m najprawdopodobniej musi wynikać z jakiegoś błędu w analizie prątków.

c) Przemiana wodna. Musimy przyjąć że 681 mg C glukozy spaliło się, a reszta C glukozy t. zn. około 150 mg C (średnio) zostało odłożonych w prątkach. Ilość wody powstałej ze spalania glukozy = 1021.

Jeśli weźmiemy O reszt. jako podstawę do obliczeń powstałej wody to mamy wody powstałej z dehydratacji biosyntetycznej = $1227 - 1021 = 206$ mg t. zn. na 375 mg glukozy powstaje 206 mg H_2O czyli na 1 cząsteczkę glukozy przypada aż 6 cząsteczek H_2O . Nie są to obliczenia ścisłe, mimo to można z nich wyciągnąć wniosek, że na pewno podczas przybierania na wadze masy prątkowej dzięki glukozie, równolegle odbywa się silna dehydratacja substratu.

Wnioski wyciągnięte z wyników drugiego doświadczenia.

Pod wieloma względami przemiana materii prątków w obecności glukozy i przy nieobecności związków azotowych jest zbliżona do przemiany glicerolowej, a mianowicie:

1). Obserwujemy wzrost masy prątkowej o 16,5%. Piąta część C zużytej glukozy przeszła w prątki, reszta uległa całkowitemu spalaniu.

2). Stwierdzono spadek zawartości azotu w prątkach.

3). Praktycznie nie ma katabolitów w podłożu.

4). Ani ciał organicznych, ani azotowych, ani amoniaku nie zostało przy tym wydzielonych. Proces autolizy nie zachodzi.

5). pH na początku wynosi 6,85, na końcu 6,60.

6). Przy biosyntezie glukoza ulega na pewno silnej dehydratacji.

7). Iloraz oddechowy = 1,04 — jest więc nieco większy od I. S. glukozy. Jest to może w łączności z nadilorazowością tego związku w stosunku do I. S. prątków, który wynosi 0,86.

Tablica XIV.

Bilans pierwiastkowy organicznego szczepu H5 w warunkach tlenowych wobec glukozy (w mg na całą zawartość układu zamkniętego).

Pobrane ze środowiska	Substrat	Ubytek w %	C	O	H	N	Masa wybranych i wydzielonych ciał
	Glukoza	47,1	800	1067	134		2001
	O ₂	62,5		1749			
Suma pobranych pierwiastków z związków							
Masa i skład pierwiastków bakterii przed dośw.							
			800	2816	134		
			948	454	133	158	¹⁾ 1692
Masa i skład po doświadczeniu							
			1112	545	161	171	1989
Różnica							
			+ 164	91	28	13?	297 bez popiołu
Zmiany w zawartości Corgan i N w podłożu							
			— 832			+ 2,4	
Związki wydalone	Ilość C i O w CO ₂ (gaz i pożywka)		681	1817			gaz 2472 płyn 26 2498
	Ilość powstałego O i H			1090	162		O/H = 6,73
	Ilość N i H w N H ₃					+ 0,2	

¹⁾ Ilość obliczona z przemiany azotowej kontroli i z zawartości N w prątkach

Doświadczenie 3.

Przemiana węglowa, azotowa i gazowa prątków szczepu H5 w warunkach tlenowych wobec kwasu cytrynowego jako jedyne go źródła węgla przy braku związków azotowych.

a) Ogólne dane. Prątki szczepu H5 wyhodowano w kolbie o pojemności 2232 ml na 219 ml pożywki N. K. w ciągu 24 dni. Z ubytku azotu z pożywki i z procentowej zawartości azotu w pozostałej masie prątków w doświadczeniu równoległym obliczono ilość wyhodowanych prątków w kolbie doświadczalnej w mg na suchą wagę (1785 mg). Zawartość popiołu: 6,2%.

Po dwukrotnym podwarstwieniu kożucha wyjałowioną wodą destylowaną poddano prątki 5-ciodniowemu głodzeniu z trzecią porcją wody destylowanej. Po okresie głodowym kożuch podwarstwiono wodnym roztworem o następującym składzie: 0,6% kwasu cytrynowego, 0,5% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4$ oraz KOH (2% aż do otrzymania $pH=7,2$). Kolbę napełniono mieszaniną gazową o składzie 39,2% O_2 i 60,8% N_2 . Po 19 dniach wykonano analizy podłoża, gazu i prątków (na C i N).

Wyniki pierwiastkowych analiz prątków. Na początku doświadczenia C=53,9%, N=8,5% popiołu 6,20%; po doświadczeniu C=53,5%, N=8,5% popiołu 5,00%. Po doświadczeniu pozostało prątków 1585 mg suchej masy o zawartości popiołu = 5,0%.

b) Przemiana węglowa. Węgla kwasu cytrynowego ubyło z podłoża 59 mg (Tabl. XV). Węgla prątków ubyło dwa razy więcej bo 114. Część węgla, którego ubyło, ukazała się w CO_2 w ilości 82,5 mg, a część w podłożu w ilości 88 mg. Ostatnią ilość obliczono w ten sposób, że do przybyłej całkowitej ilości C=29 mg, oznaczonej metodą mokrą, dodano tę ilość, która przybyła na miejsce ubytku węgla kwasu cytrynowego. Suma ubytków C=173 mg, suma przybyłych ilości węgla = 170,5 mg. Z tych liczb wnioskujemy: 1) że przynajmniej 23,5 mg Cco_2 pochodzi z prątków, z ich oddychania endogenicznego, 2) że przynajmniej 29 mg C organ. przedostało się z prątków do podłoża i 3) że część kwasu cytrynowego zniknęła z podłoża. Jednakże nie jesteśmy w stanie powiedzieć, jakim przemianom uległ kwas — czy został całkowicie utleniony, czy też katabolity jego pozostały pod postacią związków organicznych w podłożu.

Tabela XV.

Doświadczenie 3. Bilans pierwiastkowy organiczny dla szczepu H5 w warunkach tlenowych wobec kwasu cytrynowego w mg (przeliczony na całość środowiska).

		C	O	N	Masa	Ubytek w %
Kwas cytryno- wy bezwodny	przed doświadc.	457			1220	
	po doświadc.	398			1061	
	różnica	— 59			— 159	13%
Węgiel orga- niczny i azot całkowity	przed doświadc.	465		0,8		
	po doświadc.	494		26,1		
	różnica	+ 29		+ 25,3		
Ubytek tlenu	przed doświadc.		975,5			
	po doświadc.		688,1			
	różnica		— 287,4		— 287,4	— 29,5%
Utwor- zony CO ₂		+ 82,5	+ 219,8		+ 302,3	
Amoniak	przed doświadc.			0,6		
	po doświadc.			18,9		
	różnica			+ 18,3		
Prątki	przed doświadc.	962		152	1785 z pop.	
	po doświadc.	848		135	1585 z pop.	
	różnica	— 114		— 17	— 200	— 11,2%

c) Przemiana azotowa. Liczby dotyczące przemiany azotowej są ze sobą mało zgodne. Przyczyną tego jest stosunkowo mały zasięg przemian i względnie wielki błąd doświadczalny. Mimo tych niedociągnięć można z danych dotyczących przemiany azotowej stwierdzić, że prątki w czasie doświadczenia wydzieliły stosunkowo sporą ilość amoniaku.

Większość faktów doświadczalnych (t. zn. spadek ciężaru masy bakteryjnej, oddychanie endogeniczne, wydzielanie ciał organicznych i amoniaku) wskazują na to, że prątki w obecności kwasu cytrynowego i tlenu zachowują się tak jak gdyby znajdowały się w warunkach głodowych. Z tego wynika, że kwas cytrynowy, mimo jego częściowego rozkładu spowodowanego przez obecność bakterii, nie jest dla nich odżywką tak jak glicerol.

Doświadczenie 4.

Ogólna przemiana węglowa, azotowa i gazowa prątków gruzliczych wobec asparaginy.

a) Ogólne dane. Po dwudziestocztero-dniowym rozwoju szczepu H5 na pożywce N. K. poddano szczep 6-ciodniowemu postowi w obecności roztworu wodnego 0,5% K_2HPO_4 . Po usunięciu roztworu wodnego podwarstwiono hodowlę nowym roztworem wodnym zawierającym 1,53% bezwodnej asparaginy 0,5% K_2HPO_4 i 0,025% $MgSO_4$. Objętość podłoża: 232,7 ml. Objętość fazy gazowej: 1903,6 ml o zawartości tlenu = 39,4% i o zawartości azotu 60,6%. W temp. 17,1° ciśnienie wewnątrz kolby wynosiło 724,7 mm Hg. Kolbę z zawartością pozostawiono w termostacie na przeciąg 13 dni po czym wykonano analizy. Dane dotyczące tego doświadczenia są podane na tablicy XVI.

b) Przemiana węglowa. Z ilości ubytku N amin obliczona ilość ubytku węgla asparaginy wynosi 448 mg. Gdy tymczasem ubytek węgla całkowitego z podłoża wynosi 260 mg. Natomiast ubytek węgla w prątkach przebiegający równolegle z ubytkiem masy bakteryjnej jest nie wielki bo 82 mg. W sumie mamy ubytek węgla z podłoża i z kożucha wynoszący 342 mg. Ilość węgla zawartego w powstałym dwutlenku węgla wynosi 329 mg. Porównując dwie ostatnie liczby dochodzi się do wniosku, że z utlenieniem asparaginy występuje jednocześnie oddychanie endogeniczne. Iloraz oddechowy

0,96 wskazuje, że prątki spalając asparaginę równocześnie oddychają endogenicznie. Iloraz oddechowy prątków w głodzie wynosi przeciętnie 0,76. Iloraz spaleniowy zdeaminowanej i zdeamidowanej asparaginy czyli kwasu bursztynowego wynosi = 1,14.

Prątki, mimo że zużywają sporo asparaginy spalając ją całkowicie po usunięciu grup aminowych zachowują się tak jak w głodzie t. zn. tracą na wadze

Tablica XVI.

Bilans węglowy i azotowy szczepu H5 w warunkach tlenowych wobec asparaginy w mg (przeliczony na całość układu)

	C	N	Całkowita masa
Asparagina pobrana	448	N amin 131 N amid 165	1233 bezw.
Ubytek całkowitego C i N z pożywki	260	67	
Powstała ilość NNH_3		236	
Powstała ilość Cco_2	329		
Cm i Nm i masa prątków przed doświadczeniem	1103	175,6	2023
Cm i Nm i masa prątków po doświadczeniu	1021	178,7	1964
Różnica (Δ Cm, Δ Nm)	— 82	+ 3,1	— 59

i oddychają endogenicznie. Z ubytku grupy aminowej obliczona ilość C = 448 mg (reszty bezazotowej) przewyższa znacznie całkowity ubytek C z pożywki (260 mg). Nie cała reszta asparaginy po zdeaminowaniu uległa utlenieniu. Z tego wniosek, że z dezaminacją nie zawsze jest związane wchłanianie.

c) Przemiana azotowa. Zawartość azotu w prątkach (mimo spadku ich wagi) nie uległa takiej zmianie, aby mogła odgrywać rolę w ogólnym bilansie azotowym. Zawar-

tość azotu całkowitego w podłożu spadła o 67 mg t. zn. o około 9%. Asparagina została zdezaminowana i zdezamidowana w ilości N amin = 131 mg i N amid = 165 mg. W sumie N = 296 mg. Na podstawie tych danych powinno się odnaleźć azot odłączony od asparaginy pod postacią amoniaku. Ilość znalezionej amoniaku w podłożu wynosi $\text{NNH}_3 = 236$ mg zamiast 296 mg. Brak 63 mg azotu równa się w przybliżeniu ubytkowi azotu całkowitego w podłożu (67 mg). Nie wiadomo gdzie się ten azot podział.

W obecności asparaginy jako jedyne go związku organicznego prątki zachowują się częściowo tak jak w głodzie, ponieważ 1) ciężar ich spada, 2) obok spalania asparaginy występuje oddychanie endogeniczne, 3) mamy wzrost procentowej zawartości azotu w prątkach.

Inne dane. PH podłoża na początku doświadczenia 7,2 pod koniec 6,9.

Skład pierwiastkowy prątków na początku i po doświadczeniu:

na początku

C = 53,90%, O = 23,30%, H = 7,90%, N = 8,70% popiół = 6,20%
po doświadczeniu

C = 52,00%, O = 27,10%, H = 7,70%, N = 9,10% popiół = 4,10%.

D. Zmiany zawartości różnych składników (frakcji) bakterii spowodowane przez zmiany środowiska.

Znany jest fakt, że skład chemiczny bakterii i zawartość w nich soli są zależne od rodzaju pożywki, na której je wyhodowano. W pracy niniejszej hodowano badane szczepy prawie wyłącznie na pożywce N. K. Po wielu pasażach na tej pożywce badany skład pierwiastkowy bakterii, zawartość tłuszczów, białek i węglowodanów ustabilizował się.

Z badań nad metabolizmem w głodzie wynikało, że w procesie oddychania endogenicznego najprawdopodobniej ulegają utlenieniu ciała tłuszczowe przy spadku wagi masy bakteryjnej. Stosując glicerol jako jedyne źródło węgla w warunkach tlenowych, stwierdzono wydatny przyrost masy bakteryjnej.

Celem niniejszych doświadczeń, których wyniki umieszczone są na tablicy XVII, było stwierdzenie jakim zmianom ulegała zawartość różnych składników bakterii przez głodzenie względnie przez żywienie glicerolem. Do tych doświadczeń

wysiano na pożywkę N. K. umieszczoną w sześciu kolbach, szczep H5.

Po 28-dniowym wzroście zanalizowano 3 kożuchy mas bakteryjnych pobrane z trzech kolb na zawartość frakcji acetonowej (tłuszcze właściwe), frakcji eterowej (fosfatydy), węglowodanów i azotu.

Z wyników analiz tych trzech prób wzięto średnie wielkości jako dane wyjściowe przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia t. zn. przed głodzeniem wzgl. tuczeniem glicerolem. Z ubytku azotu w podłożu i z procentowej zawartości azotu w prątkach, obliczono masę prątków w pozostałych trzech kolbach doświadczalnych (na podstawie wielokrotnie stwierdzonej równości ΔN z pożywki = Nm). Dwie kolby doświadczalne podwarstwiono roztworem wodnym 0,25% K_2HPO_4 , — a jedną roztworem 4,5% glicerolu, 1% K_2HPO_4 , do którego dodano amoniaku aż do zubożenia. Po pewnym czasie podanym na tablicy zanalizowano prątki na zawartość tłuszczów właściwych (frakcja acetonowa), fosfatydów (frakcja eterowa), na zawartość węglowodanów (jako glukozy) i na procent azotu.

Wyniki doświadczeń.

1). Prątki podczas głodzenia tracą swój ciężar przede wszystkim z powodu ubytku tłuszczów właściwych, a w drugim rzędzie z powodu ubytku węglowodanów. Stwierdzenie to jest zgodne z otrzymanym ilorazem oddechowym bakterii w czasie głodu. — Iloraz ten wskazywał na spalanie własnego tłuszczu.

2). Ciekawe jest stwierdzenie, że zawartość fosfatydów w bakteriach w czasie głodzenia ulega tylko nieznacznym zmianom. Bakterie nie pozbywają się tego ważnego składnika w czasie głodu.

3). Również drugi ważny składnik bakterii, mianowicie azot nie ulega zmianom w czasie głodzenia. Spadek ciężaru ciała bakteryjnego powoduje zwiększenie procentowej zawartości azotu w prątkach.

4). W obecności glicerolu prątki przybierają na wadze dzięki odkładaniu tłuszczów właściwych: przy czym ilość fosfatydów w prątkach nie ulega zmianie przy nieznacznym wzroście zawartości cukrów.

Tablica XVII.

Zmiany zawartości różnych frakcji w prątkach, spowodowane przez głodzenie i tuczenie. Ilości podane w mg.
(w dośw. I. i II. podawano O. 25% K_2HPO_4)

G ł o d z e n i e. (Doświadczenie I.)

	Sucha ma- sa prątków	% frakcji acetonowej	Całkowita ilość frakcji acetonowej	% frakcji eterowej	Całkowita ilość frakcji eterowej	Węglowod. w % glukozy	Całkowita ilość węglowod.	% azotu	Całkowita ilość azotu
Przed doświadczeniem	1315	12,5	164	16,7	220	12,8	168	8,3	109,0
Po 22 dniach	1142	5,2	59	19,4	221	11,5	131	8,9	101,5
Różnica	— 173		— 105		— 1		— 37		— 7,5

G ł o d z e n i e. (Doświadczenie II.)

Przed doświadczeniem	1115	12,5	139	16,7	186	12,8	144	8,3	92,5
Po 29 dniach	921	5,2	48	18,9	174	8,4	77	8,93	82,0
Różnica	— 194		— 91		— 12		— 67		— 10,5

T u c z e n i e. (4,5% glicerolu) (1% KH_2PO_4 — NH_3) (do zobojętnienia). Ilości podano w mg.)

Przed doświadczeniem	1290	12,5	161	16,7	215	12,8	165		
Po 26 dniach	1519	22,2	337	13,8	210	12,4	188		
Różnica	— 229		+ 176		— 5		+ 17		

E. Metabolizm w anaerobiozie.

(Wyniki badań podano fragmentarycznie z powodu zaginięcia protokołów doświadczalnych).

Prątki gruźlicze giną prędko w warunkach beztlenowych. Nieraz mała zawartość tlenu 1—2% (reszta azot) wystarcza, aby je dłuższy czas zachować przy życiu. W całkowitej anaerobiozie giną w przeciągu doby. Po kilku dniach ukazują się już objawy autolizy niezależnie od tego jakie substraty wchodziły w skład podłoża. Zbadano metabolizm w anaerobiozie w obecności następujących podłoży: 1) woda destylowana, 2) 1,5% i 4% glicerolu, 3) 5% glukozy, 4) 0,8% asparaginy (Tablice X i XVIII).

1). 100 ml wody destylowanej pozostawiono w styczności z obfitym kożuchem prątków (H5) na przeciąg 19 dni. Analiza podłoża po tym czasie wykazała $\approx C^{II} \text{ org.} = 81,5 \text{ mg}$ na 100 ml, $\approx N^{II} \text{ org.} = 6,9 \text{ mg}$, $C_{co} =$ ślady, $PH = 5,0$ Klarowne podłoże nabrało barwy bananowej. Wykazano obecność białka i węglowodanów. Białko miało własności polipeptydów i zawierało siarkę. W innym analogicznym doświadczeniu wykazano:

$\approx C^{II} \text{ org.} = 10,9 \text{ mg}$, $\approx N^{II} \text{ org.} = 7,9 \text{ mg}$, $PH = 4,6$.

2). Kożuch bakteryjny (H5) podwarstwiono na przeciąg 14 dni jałowym roztworem składającym się z 1,5% glicerolu, 0,25% K_2HPO_4 , $\Delta C \text{ org. met. mokr.} = + 204 \text{ mg}$ na 100 ml. $\Delta \approx N = 33,5 \text{ mg}$ i $NNH_3 = 4,6 \text{ mg}$. Zawartość glicerolu w podłożu nie zmieniła się, więc nie wystąpiła beztlenowa fermentacja tego związku. W podłożu pojawiają się ciała organiczne azotowe o dużej ilości grup NH_2 ($NNH_2 = +15,6 \text{ mg}$ na 100 ml). Podłoże zostało silnie zakwaszone. Drugie analogiczne doświadczenie podano na Tablicy X.

3). Prątki szczepu H5 glikolizują cukier gronowy w atmosferze azotu. Skład podłoża: 5% glukozy, 1,5% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4$. Objętość podłoża = 100 ml. Ciężar suchych prątków = 1,7 g. Po 18 dniach ubyło 24% glukozy. W podłożu stwierdzono kwas mlekowy, etanol, aldehyd octowy. Powstały ślady C_{co_2} , $PH = 4,3$. Obok tych procesów dotyczących glikolizy obserwuje się procesy związane z autolizą (Tabl. XVIII).

4). Przy podaniu asparaginy w podłożach w warunkach beztlenowych spostrzega się obok autolizy silne działanie asparaginazy. Wielka ilość powstałego amoniaku powoduje zalkalizowanie podłoża. (Tablica X).

Tablica XVIII.

Zestawienie różnych metabolizmów szczepów „H5” i „H3”

		Głód	glicerol	glukoza	aspiragina	kwas cytrynowy	
Aerobioza	Trwanie doświad. w dniach	43	20	19	13	19	
	Katabolity węglowe	—	—	—	+	++	
	Katabolity azotowe	—	—	—	?	?	
	Wydzielanie CO ₂	++	++++	++++	+	+	
	Wydzielanie NH ₃	+	—	—	++	+	
	J. O. = $\frac{CO_2}{O_2}$	0,77	0,86	1,04	0,96	0,95	
	Oddychanie endogeniczne	wyłączne	—	—	+	+	
	Masa prątków	ubywa	przybywa 20%	przybywa 17%	ubywa	ubywa	
	% N w prątkach	wzrost	spadek	spadek	wrost	bez zmiany	
	P _H podłoża	słabe zakwaszenie	słabe zakwaszenie	słabe zakwaszenie	słabe zakwaszenie	—	
Anaerobioza	Katabolity węglowe	węglowodany peptydy siarka	glicerol nie zaatakowany+	++++ ferment. beztien.	+		
	Katabolity azotowe	peptydy siarka	+	+	+		
	Wydzielanie CO ₂	ślady	ślady	ślady	—		
	Wydzielanie NH ₃	+	+	+	++++ aspiragina		
	Autoliza	+	+	+	+		
	P _H podłoża	silne zakwaszenie	silne zakwaszenie	zakwaszenie silne	zalkalizowanie		

Na tablicy XVIII mamy porównawcze zestawienie przemian zachodzących w warunkach tlenowych i beztlenowych. W anaerobiozie pewne układy enzymatyczne prątków (układ glikolizy, asparaginaza) wykazują wydätne swoje działanie.

IV. Zestawienie ważniejszych wyników.

Zbadane zostały następujące przemiany organiczne:

1). Przemiana podczas rozwoju prątków (Metabolizm ten jest związany z produkcją ciała drobnoustrojowego. Zbadano dwa szczepy typu ludzkiego, jeden — bydłecgo i szczep B. C. G.).

2). Przemiana głodzonych prątków typu ludzkiego.

3). Metabolizm oddzielnie podanych poszczególnych składników pożywek syntetycznych, a więc metabolizm glicerolu, glukozy, kwasu cytrynowego i asparaginy, w obecności szczepu typu ludzkiego.

4). Przemiany wewnątrzkomórkowe. Zmiany zawartości różnych składników bakterii spowodowane przez zmiany środowiska, w którym żyją.

5). Obok wyników badań wymienionych przemian, podano szereg wyników innych badań związanych z przemianą w anaerobiozie, których opis przechował się tylko częściowo.

ad 1). Przemiana organiczna wzrostowa szczepów zjadliwych typu ludzkiego charakteryzuje się następującymi własnościami:

a) Podczas rozwoju prątków nie ma wydzielania katabolitów organicznych (ani bezazotowych, ani azotowych), innymi słowy nie zachodzi proces fermentacji.

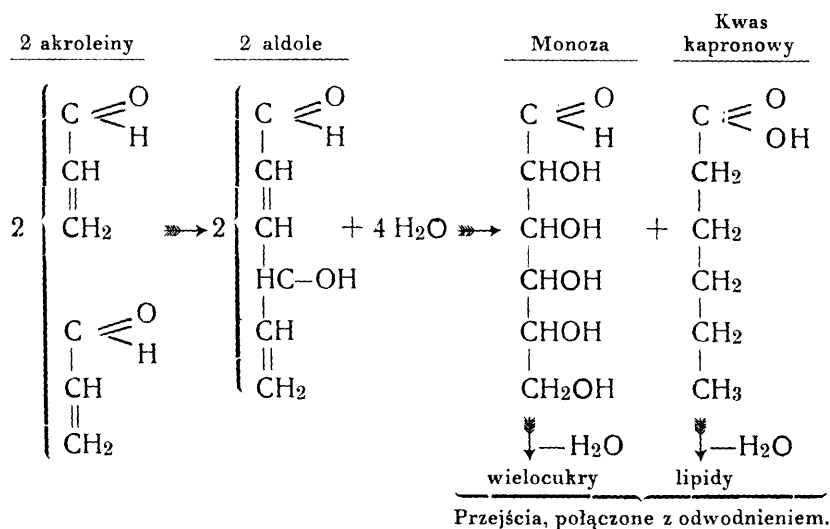
b) Większość węgla odłożona w ciełe bakteryjnym pochodzi od glicerolu — w pierwszym doświadczeniu przynajmniej $\frac{3}{4}$ tego węgla w drugim — przynajmniej $\frac{2}{3}$, przy tym reszta węgla pochodziłaby z asparaginy i kwasu cytrynowego.

c) W pierwszym doświadczeniu ilość spalonego organicznego węgla w procesie oddychania równa się mniej więcej ilości odłożonego węgla w prątkach. W drugim doświadczeniu ilość spalonego węgla przewyższa o niecałe 15% węgla odłożonego.

d) Ilość wydzielonej wody przez prątki w czasie rozwoju jest półtora razy (150%) większa od ilości powstałej masy bakteryjnej. Większa część tej wody stanowi woda powstała przy procesie oddychania, bo około 110%, reszta 40% pochodzi od dehydratacji biosyntetycznej, czyli jest związana z konstrukcją ciała bakteryjnego.

e) Z równań względnych odzwierciedlających proces budowy ciała prątka wynika, że na 1 cząsteczkę zaasymilowanego glicerolu wydają się dwie cząsteczki wody. Z tego można wyciągnąć wniosek, że jako produkt pośredni przy biosyntezie może powstawać akroleina.

Drogę powstawania lipidów i węglowodanów z akroleiny możnaby sobie wyobrazić w następujący sposób: akroleina ulega kondensacji aldolowej, po czym następuje wzajemny proces redoksoowy między aldolami i w końcu dehydratacja połączona z tworzeniem się lipidów, wielocukrów i białek.



Inna koncepcja byłaby: najpierw kondensacja aldolowa oddechu glicerolowego, a następnie odwodnienie i oksydoredukcja.

Te koncepcje mogą służyć za hipotezy robocze. Jest to przykład wyprowadzenia wniosków z ogólnej przemiany organicznej o przemianie pośredniej.

f) Azot prątka i azot powstałego amoniaku w podłożu pochodzą z jednego źródła azotu — z asparaginy. Amoniak pochodzi z enzymatycznej dezamidacji asparaginy. Enzym katalizujący tę reakcję — asparaginaza — jest związany ze strukturą komórki. Nasze badania nie są w stanie określić jaki udział bierze węgiel asparaginowy w budowie ciała drobnoustrojowego.

Przemiana materii szczepu B. C. G. różni się wybitnie od przemian szczepów typu ludzkiego i bydłęcego. Szczep ten w czasie rozwoju wydala katabolity w takiej ilości, że dadzą się one stwierdzić metodą przez nas stosowaną. Według J. Debiesse'a¹⁾ szczep B. C. G. rosnąc na pożywce Sautona wytwarza kwas szczawiowy, kwas bursztynowy, jabłkowy i cukier mlekowy. Nasilenie przemiany materii u szczepu B. C. G. jest znacznie większe aniżeli u prątków typu ludzkiego. Zużycie substratów przeliczone na 1 g suchej masy drobnoustroju jest bez porównania większe przy, czym wytwarzają się duże ilości amoniaku z powodu silnego działania asparaginy prątków B. C. G. Przemiana gazowa przewyższa o 35% przemianę gazową prątków typu ludzkiego. Ilość przetworzonego węgla w CO_2 (Cco_2) jest prawie dwa razy większa od ilości odłożonego węgla w prątkach (Cm), natomiast u badanych szczepów typu ludzkiego Cco_2 jest prawie równe Cm . — Δ C org. met. mokr. przewyższa trzykrotnie Cm (gdy tymczasem u prątków typu ludzkiego tylko dwukrotnie). Na 1 g suchej masy prątków ubytek glicerolu przewyższa o 20%, a ubytek asparaginy 50% odpowiednie ubytki u prątków typu ludzkiego.

Jest rzeczą możliwą, że zdolności fermentacyjne szczepu B. C. G. mają pewien związek z jego własnościami antygenowymi.

Zbadany szczep typu bydłęcego zachowywał się pod względem przemiany materii podobnie jak prątki typu ludzkiego, mimo, że był hodowany w innych warunkach — mianowicie na pożywce Sautona w obecności 100% wolnego tlenu. Nie wydalał katabolitów organicznych, a więc nie fermentował. Stwierdzono stosunkowo dużą przemianę gazową. Nasilenie procesu oddychania było tu dwa razy większe niż u typu ludzkiego. Przypuszczać należy, że objaw ten jest w łączności ze stężeniem tlenu w środowisku rozwoju. W tym przypadku stężenie to było w przybliżeniu dwa razy większe niż w doświadczeniach z typem ludzkim.

ad 2). Głodzenie prątków. W warunkach tlenowych w czasie głodzenia prątków, będących w ciągu 43 dni głodu w stężności z 0,05%-wym roztworem K_2HPO_4 i 0,05% MgSO_4 , nie występuje proces autolizy. Prątki są żywe i nie wytwarzają katabolitów organicznych.

Następujące objawy towarzyszą głodzeniu prątków (Tablica X).

¹⁾ Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, T. XVIII N. 2, 135, 1939.

a) Spadek ciężaru suchej masy prątków, zwiększający się w miarę trwania czasu głodzenia. Po 43 dniach głodu spadek ten wynosi 26,7% ciężaru początkowego suchych prątków. Ubytek masy prątków pochodzi przede wszystkim od oddychania endogenicznego (Tabl. IX) przy czym zostają zużyte substancje zapasowe.

b) Niski iloraz oddechowy (przeciętnie 7,8) wskazuje na przeważające spalanie lipidów. Badania nad zmianą w bakteriach zawartości różnych frakcji w czasie głodu wykazały, że w pierwszym rzędzie zostają spalane tłuszcze właściwe, w drugim — węglowodany. Ubytek węglowodanów jest wybitnie mniejszy. Stwierdzenia te są zgodne z otrzymanym ilorazem oddechowym.

c) Nasilenie oddychania endogenicznego, które jest w pierwszych 3—4 dniach znaczne, potem maleje i ustala się, trwając bez ustanku do 43 dnia głodu.

d) Wzrost procentowej zawartości azotu w prątkach głodzonych wskazuje na dążność do zatrzymania azotu w ustroju. Część jednak azotu zostaje wydzielona pod postacią azotu amoniakalnego. Ilość ta wzrasta z czasem trwania głodu.

ad 3). Glicerol i glukoza są doskonałymi źródłami węgla dla prątków. Podane w podłożu jako jedyne źródła węgla w warunkach bezazotowych i w obecności tlenu powodują wzrost masy bakteryjnej. Przy podaniu samego glicerolu osiągnięto przyrost suchej masy o 19,7%, przy podaniu samej glukozy — 16,5%. Ze wzrostem masy prątkowej, zmniejsza się odpowiednia procentowa zawartość azotu w prątkach. Część pobranego glicerolu względnie glukozy ulega całkowitemu utlenieniu (oddychanie), część przekształca się w ciało bakteryjne bez wydzielania katabolitów organicznych. Z procesem przekształcenia się glicerolu jest związane silne odwodnienie tego substratu. Z tablicy XVIII wynika, że biosynteza ta prowadzi do tworzenia się tłuszczów. Można sobie tu wyobrazić przebieg przemiany pośredniej podanej na str. 87, jednak z tą różnicą, że powstała monoza ulegałaby całkowitemu utlenieniu z pozostawieniem kwasów tłuszczowych. Iloraz oddechowy przy podaniu glicerolu jest zbliżony do ilorazu spaleniowego (0,875) glicerolu, przy podawaniu glukozy jest bliski jedności co odpowiada I. S. glukozy.

Przy podawaniu asparaginy, także kwasu asparaginowego, glikokolu, alaniny, glutaminy¹⁾ jako jedynych związków organicznych w obecności 0,5% K_2HPO_4 i 0,05% $MgSO_4$ prątki

¹⁾ Protokoły odnośnych doświadczeń zaginęły. Podają dane o związkach umieszczonych w nawiasie z pamięci.

zachowują się tak jak w głodzie. Mianowicie można zaobserwować: a) oddychanie endogeniczne, b) wzrost zawartości N w prątkach i c) spadek suchej masy prątków. Przy podaniu asparaginy (kwasu asparaginowego) mamy obok oddychania endogenicznego i spalanie substratów. W jednym doświadczeniu, którego protokół zaginął, stwierdzono, że małe ilości glicerolu (0,6%) wystarczają, ażeby zdolność atakowania asparaginy (0,8%) przez prątki znacznie się zwiększyła. Wychodzi tu na jaw niewątpliwy wpływ przemiany jednego substratu na przemianę drugiego.

Również i kwas cytrynowy w obecności tlenu (mimo częściowego jego rozkładu spowodowanego przez obecność bakterii), jest pojedynczo podany niepełnowartościowym substratem. Na to wskazuje spadek ciężaru masy bakteryjnej, oddychanie endogeniczne oraz wydzielanie ciał organicznych i amoniaku.

ad 4) Przemiany wewnątrzkomórkowe zostały zbadane oddzielnie nie razem z przemianami ogólnymi. (Właściwie obie te przemiany powinny być zbadane razem w jednym doświadczeniu). Badania te wykazały, że: a) prątki podczas głodzenia tracą swój ciężar przede wszystkim z powodu ubytku tłuszczów właściwych, a w drugim rzędzie z powodu ubytku węglowodanów (Tablica XVIII), b) zawartość fosfatydów (frakcja eterowa) w prątkach uległa podczas głodzenia tylko nieznacznym zmianom, c) również całkowita zawartość azotu nie ulega większym zmianom w trakcie głodzenia, d) w obecności glicerolu prątki przybierają na wadze przede wszystkim z powodu odkładania tłuszczów właściwych. Ilość odłożonych przy tym węglowodanów jest nieznaczna, a zawartość fosfatydów w prątkach nie uległa zmianie.

ad 5) Osobna seria naszych doświadczeń dotyczyła przemian, którym podlegają prątki w warunkach beztlenowych. Na tablicy X i XVIII mamy podane wyniki badań. W anaerobicznie prątki szybko giną ulegając autolizie. W nieobecności substratów organicznych wytwarzają bezazotowe i azotowe katabolity organiczne (peptydy) i amoniak z równoczesnym spadkiem ciężaru suchej masy prątków. Prątki w anaerobiozie rozkładają glukozę tworząc kwas mlekowy, etanol i aldehyd octowy. W anaerobiozie prątki nie działają na glicerol, asparaginę zaś tylko dezamidują. W warunkach beztlenowych występuje wybitne działanie asparaginy.

V. Projekty nowych doświadczeń.

Dotychczas otrzymane wyniki badań nasuwają koncepcje pewnych nowych doświadczeń, z drugiej strony niektóre już wykonane doświadczenia wymagają powtórzenia ich z zastosowaniem ulepszonej metody. Podamy szereg projektów nowych doświadczeń z zastosowaniem ulepszonego aparatu do hodowli prątków.

1). Stwierdzone odwadnianie glicerolu przy budowie ciała prątków nasuwa myśl zastosowania jako substratu akroleiny w małym stężeniu, ponieważ związek ten działa trująco na ustrój. Ewentualnie możnaby wypróbować zdolności substratowe aldolu akroleiny i aldolu aldehydu glicerolowego.

2). Konieczne jest określenie jakościowe i ilościowe katabolitów organicznych powstałych przy rozkładzie glukozy przez prątki w warunkach beztlenowych i kwasu cytrynowego w aerobiozie.

3). Wskazane byłoby przeprowadzenie badań przemian dwóch substratów, z których jeden należałby do doskonałych substratów (glicerol lub glukoza), a drugi byłby kwasem aminowym lub kwasem cytrynowym itd. (substraten niedoskonałym — jeśli podany pojedynczo).

4). Inną serią doświadczeń dotyczyłaby badań wpływu ciał pochodzenia prątkowego na przemianę kataboliczną i anaboliczną prątków (wykonanych przy użyciu nowego aparatu do hodowli). Możliwość zbadać następujące ciała pochodzenia prątkowego: a) hydrolizaty bakteryjne otrzymane za pomocą hydrolizy kwaśnej lub zasadowej (wykonano już orientacyjne próby), b) autolizaty bakteryjne otrzymane np. przez przetrzymywanie prątków w warunkach beztlenowych, c) różne składniki prątków wyizolowane różnymi metodami z drobno-ustrojów.

5). Ciekawe byłoby zbadanie wpływu różnych związków chemicznych na organiczną przemianę prątków jak np. znanych środków chemoterapeutycznych, antybiotyków, środków dezynfekcyjnych w różnych stężeniach, barwników z grupy błękitu Nilu, wyciągów z roślin itp.

6). Inną kategorię doświadczeń stanowiłyby badania katabolicznych i anabolicznych przemian prątków w obecności ciał pochodzenia zwierzęcego i ludzkiego jak np. a) wydaliny i wydzieliny chorych i zdrowych, b) surowicy (krwi) chorych i zdrowych, c) tkanek.

7). Do ważnych badań zaliczyć możemy badania wzajemnego wpływu na przemiany z jednej strony kultury tkankowej (np. tkanki łącznej), a z drugiej — kultury bakteryjnej.

8). Można by rozszerzyć badania nad przemianą organiczną prątków wobec jednego związku organicznego podając prątkom kwasy jedno- i dwukarbonowe, różne aminokwasy, różne węglowodany, polialkohole itd.

9). Wreszcie ciekawe byłoby ustalić jakie enzymy i w jakich ilościach występują w prątkach.

10). Za pomocą stosowania substratów zawierających izotopy (pierwiastki promieniotwórcze) można by z łatwością rozwiązać wiele nierozstrzygniętych tu zagadnień syntezy drobnoustroju. Przedstawione tu teoretyczne rozważania zostały już rozszerzone przez wprowadzenie związków znaczonych izotopem.

W tych wszystkich badaniach konieczna jest współpraca z wyspecjalizowanymi bakteriologami. (Zaznaczyć należy, że metoda tutaj wprowadzona nadaje się również do badań innych drobnoustrojów).

Przy zakładzie badawczym, któryby miał za zadanie zajmować się zagadnieniami przemiany materii powinny istnieć następujące warsztaty: szklarski, mechaniczny i elektrotechniczny. Nowe pomysły tworzą nowe metody badań. Nowe metody wymagają konstrukcji specjalnych aparatów. Aparaty muszą często być zmodyfikowane w celu umożliwienia badań różnego materiału. Z tego wynika, że wspomniane warsztaty są niezbędne. Nie jakiś skomplikowany i drogi aparat zagraniczny ma tworzyć pomysły doświadczzeń, ale wręcz przeciwnie idee i pomysły tworzą aparaty. Nieraz i drogi sprowadzony aparat jest potrzebny, ale taki aparat musi nam służyć do umożliwienia lub rozszerzenia badań ułożonych na podstawie pewnej idei.

(Oprócz aparatów wymienionych w niniejszej pracy są w projekcie jeszcze inne, np. aparat do hodowli drobnoustrojów, któryby automatycznie rejestrował siedem wykresów w czasie rozwoju drobnoustroju mianowicie, przemianę gazową, ciśnienie gazu, masę bakterii, gęstość podłoża, przewodnictwo, PH i potencjał redoksy podłoża).

Przemiana materii tak kataboliczna jak i anaboliczna jest najlepszym wskaźnikiem nasilenia procesów życia. Dlatego badania te mają wielkie znaczenie (zarówno dla biologów jak i dla medycyny). Dynamika a nie statyka jest charakterystyką ustrojów żywych. (Dotychczas badania biologiczne i medyczne dotyczyły przede wszystkim zjawisk więcej statycznych, które są dostępne dla wyobraźni i prostsze w metodyce badań).

VI. Streszczenie.

Na podstawie odnalezionych protokółów doświadczeń i notatek odtworzono pracę, która zaginęła podczas powstania warszawskiego. Celem tej pracy było zbadanie właściwości metabolicznych prątków gruźliczych. Teoretyczne podstawy i metodyka badań są nowe. Zastosowano tu po raz pierwszy nową metodę badań metabolizmu, polegającą na śledzeniu t. zw. ogólnej przemiany organicznej, która dotyczy czterech pierwiastków organicznych: węgla, tlenu, wodoru i azotu. Metoda ta pozwala przedstawiać metabolizm organiczny w równaniach chemicznych, które dają się podzielić na równania oddające ogólną przemianę organiczną, na równania chemizmu budowy ciała drobnoustrojowego i na równania dotyczące procesu oddychania. Daje ona możność śledzenia dotychczas niezbadanej przemiany wodnej. Podstawy teoretyczne metody zostały omówione w pierwszej części niniejszej pracy. W drugiej części jest krótko omówiona praktyczna strona badań (z pamięci odtworzona z powodu zaginięcia jednoś notatek). Prątki hodowano na pożywce syntetycznej własnego składu w hermetycznie zamkniętych kolbach. Analizowano: gaz, podłoże i ciało drobnoustroju. Zbadane zostały: 1) przemiana rozwojowa prątków, 2) metabolizm prątków w głodzie, 3) metabolizm poszczególnych składników pożywki, 4) zmiany zawartości różnych składników prątków (tłuszczów, fosfatydów, węglowodanów i azotu) w zależności od zmiany środowiska, 5) przemiany w anaerobiozie.

Niektóre ważniejsze wyniki doświadczeń.

Prątki zjadliwe typu ludzkiego nie są drobnoustrojami fermentującymi, ponieważ spalają substraty do końcowych produktów CO_2 i H_2O . Podobnie zachowują się prątki typu bydlęcego. Natomiast u szczepu B.C.G. wyraźnie występują zdolności fermentacyjne. Glicerol jest głównym substratem stosowanym do budowy (budulcem) ciała prątków. Z asymilacją glicerolu jest związane silne odwodnienie.

Głodzone prątki typu ludzkiego oddychają przede wszystkim tłuszczem rezerwowym, w mniejszym stopniu węglowodanami. W głodzie wzrasta procentowa zawartość azotu w prątkach. Ilość fosfatydów w prątkach nie ulega zmianie. Prątki są bardzo wytrzymałe na głód w warunkach tlenowych. Prątki typu ludzkiego w obecności glicerolu lub glukozy jako jedynego źródła węgla w warunkach tlenowych przybierają na masie odkładając tłuszcz. Przy tym procentowa zawartość azotu w prątkach maleje. W obecności kwasu cytrynowego

lub asparaginy prątki zachowują się podobnie jak w głodzie. (Kwas cytrynowy ulega przy tym jakimś jeszcze nie zbadanym przemianom). Prątki wytwarzają silną asparaginazę, enzym atakujący grupę amidową asparaginy.

Prątki gruźlicze są bardzo wrażliwe na warunki beztlenowe. W krótkim przeciągu czasu giną i ulegają autolizie. W anaerobiozie prątki atakują glukozę produkując następujące katabolity organiczne: kwas mlekowy, etanol, aldehyd octowy itd. W warunkach beztlenowych nie atakują glicerolu; asparagina zaś ulega w krótkim przeciągu czasu zupełnej dezamidacji z powodu silnego działania asparaginazy.

W części czwartej niniejszej pracy przytoczono ważniejsze wyniki doświadczeń.

W części piątej podane są projekty nowych doświadczeń opartych na osiągniętych już wynikach. Niektóre z nich mogą mieć wielkie znaczenie dla medycyny.

SUMMARY.

In this work a new method has been applied for the examination of the metabolic properties of microorganisms. By the way of this method the general metabolism of the chief organic elements (carbon, oxygen, hydrogen and nitrogen) was investigated in one combined experiment. We call this kind of metabolism a general (not intermediary) and total organic metabolism. The inorganic elements have been treated summarily as ash.

On the basis of the experimental results it is possible to form a relative balance equation enabling to make some conclusions regarding the fundamental metabolic characteristics of a certain microorganism. The following results were obtained by the application of the new method to the *Mycobacterium tuberculosis*.

The virulent human and bovine tubercle bacilli do not practically excrete organic catabolites while growing on synthetic medium (during 25—35 days). The used medium resembles that of Sauton (other proportions of contents and without ammonia). For that reason we are compelled to admit that these types of *Mycobacterium* are not fermenting microorganism. The bacilli oxidize the offered organic substrates completely to carbon dioxide and water. Asparaginase bound to the bacillus body causes the desamidation of the asparagine.

The majority of the carbon assimilated by the organism for the construction of the bacillus body is of the glycerol origin (minimum 67%—75%). The amount of the completely oxidized carbon owing to respiration is approximatively equal to the quantity of carbon used for the microorganism construction. (The relation between growth and respiration).

The weight of the water excreted during the growth of the bacilli is about 1,5 times greater than the weight of the dry bacteria mass produced at the same time. The larger part of this water is derived from the respiratory process (73%). The rest is the result of the process of the organism construction. We call this kind of water excretion biosynthetic dehydration.

From the relative balance equation we can conclude that with one assimilated glycerol molecule for the production of bacilli two water molecules are excreted during their growth.

The general and total organic metabolism of the B.C.G. bacillus strain differs distinctly from that of the virulent strains of the human and bovine types. The B.C.G. strain excretes organic catabolites during its growth on the synthetic media. Therefore it is more a fermenting organism. It produces succinic, malic, and oxalic acids (besides other catabolites). The substrates consumption during its growth is considerably greater in the case of B.C.G. strain in comparison with that of the virulent types. It is probable that the fermentative abilities of the B.C.G. strain have a connection with the antigenic properties of the strain.

The decrease of the dry bacilli mass during the starvation period (35—45 days) derives chiefly from the total oxidation of glycerides (fats), which form a constituent part of the bacterial body. The phosphatides of the bacilli are not attacked. The quantity of the oxidized carbohydrates during starvation are remarkably smaller. The respiratory quotient in the starvation period is very low (7,2—7,9). The nitrogen content of the bacteria increases during starvation, a part of the nitrogen is excreted as ammonia. The resistance of *Mycobacterium tuberculosis* against starvation is very great.

Glycerol and glucose are perfect carbon sources for the tubercle bacilli — but not citric acid and aminoacids as sole carbon sources. In the presence of the former substrates and in aerobic conditions the dry mass of bacilli increases remarkably. Simultaneously with the increase of the mass we

observe a decrease of the nitrogen content. We emphasize the fact that the nitrogen and lipid contents in living cells is very variable and depends on the condition of life. We could establish that the formation of glycerides derives from glycerol respectively from glucose (with a great biosynthetic dehydration) and without excretion of organic catabolites. The respiratory quotient corresponds to the combustion quotient of the offered substrates that is for glycerol 0,87, for glucose 1,0. No change in phosphatides content could be observed.

In anaerobic conditions the autolytic process of the cells of tubercle bacilli appears in a short time. In that case we have often to do with two coexisting processes — with autolysis and with metabolism of the offered substrates. The way of the substrate metabolism in anaerobic conditions differs profoundly from the way in aerobic conditions.

Treść zeszytu 3-4. — Contents.

	Str.
Ślopek Stefan. Szczepionka precypitowana durowo-paradurowa (T.A.B. prec.). Alaun-precipitated typhoid-paratyphoid vaccine (T.A.B.)	171
Wojciechowski Edmund. Próby oceny własności uodparniających szczepionek przeciw durowi plamistemu.	189
The evaluation of the immunizing properties of the epidemic typhus vaccines	208
Buczowski Zenon. Zachowanie się bakteriofaga durowego w środowiskach zakażonych pałeczką durową. — The comportement of the typhoid bacteriophage in with typhoid bacilli infected environments	211
Kuryłowicz W. — Ślopek St. Z badań nad biologią pałeczek czerwonych. Pokrewieństwo antygenowe pałeczek okrężnicy (Bact. coli) z pałeczkami durowo-paradurowymi i czerwonymi. — The antigenic similarity of the colon group of bacteria and bacteria of Salmonella and dysentery group	229
Konopacka Bronisława. Z histologii i histofizjologii komara Anopheles maculipennis, nosiciela malarii w Polsce. — Histology and histophysiology of Anopheles maculipennis	252
Malec Edward. Nowe metody badań neosalwarsanów. — New methods of neosalvarsan examination	264
Sym Ernest. Przemiana materii prątków gruźlicy. — Metabolism of. B. Tuberculosis	295

G. 6227/78

A.048

