

Б. Г. Аветикян

Эмбриональный экстракт как стимулятор размножения бактерий

Проблема стимуляции размножения клеток и роста организмов является одной из важных проблем, усиленно разрабатываемых в современной биологии.

Общезвестна роль пищи, витаминов, гормонов в процессах ускорения роста организмов. Однако помимо веществ, относящихся к этим группам, есть еще целый ряд других, важность которых для роста и размножения организмов выясняется в последние десятилетия.

Интенсивный рост сопровождается усилением окислительно-восстановительных процессов в организме. Целый ряд веществ, которые являются катализаторами, способствующими окислению протоплазмы, и переносчиками водорода, влияют на размножение клеток. Было установлено, что эмбриональные ткани особенно богаты подобными ростовыми веществами. Известно также, что эмбриональные экстракты издавна применяются для целей получения тканевых культур.

Исследованиями последних лет установлено, что многие виды бактерий обладают способностью вырабатывать ростовые вещества. К числу подобных бактерий относятся кишечная палочка, различные молочнокислые микробы и ряд других сапрофитов. Менее изучен вопрос о факторах роста патогенных бактерий. В частности, в литературе имеется мало данных о действии на патогенные бактерии ростовых веществ, содержащихся в растущем организме молодого животного. Между тем, этот вопрос представляет определенный интерес как с медицинской точки зрения, так и с точки зрения биологической.

В настоящей работе приводятся результаты исследования действия экстрактов из эмбриональных тканей на рост бактерий.

М е т о д и к а

В целях получения ориентировочных данных было решено сначала испытать действие эмбрионального экстракта на бактерии при помощи метода, принятого в биологии и протозоологии и мало обычного для бактериологии. Выращивание культур производилось под микроскопом, на нагревательном столике, где велось прямое наблюдение за ходом и частотой деления бактерий. В этих первых ориентировочных опытах были получены столь четкие результаты, что мы предпочли провести всю дальнейшую работу, пользуясь той же методикой выращивания и изучения культуры *in situ*. Для этого понадобилось одновременное использование нескольких нагревательных установок, благодаря чему сокращалось время исследования.

Техника приготовления экстракта была следующей. Ткани куриных эмбрионов 10-дневной инкубации были измельчены, полученная кашица была залита десятикратным количеством физиологического раствора (0,85%) хлористого натрия в биде-стиллированной воде. После размешивания взвесь эмбриональных тканей была выдержана в течение одного часа на холоде, затем надосадочная жидкость была слита, профильтрована через бактериальный фильтр и разлита в ампулы, которые хранились в запаянном виде в холодильнике. Во всех опытах был применен эмбриональный экстракт одного приготовления.

Для проверки действия экстракта мы не могли применять обычные питательные среды, употребляемые в бактериологии, так как все они содержат разнообразные вещества с невыясненным химическим составом, получаемые при разрушении белковой молекулы. Поэтому в качестве среды был употреблен модифицированный питательный раствор Френкеля. В контрольных опытах был применен мясо-пептонный бульон. Среда подвергалась дробной стерилизации и хранилась на холоде.

За 1—2 часа до постановки опыта, пробирки со средами (по 10 мл) ставились в термостат для нагревания до 37° С, лишь после этого они вынимались для засева. Перед засевом в одну из пробирок с синтетической средой микропипеткой добавлялось 0,01 мл эмбрионального экстракта. Таким образом, концентрация экстракта соответствовала 0,1%.

В литературе имеются указания на то, что результаты выращивания простейших в висячей капле зависят от количества внесенных при засеве особей. Поэтому мы производили заражение питательной среды путем внесения в нее определенного объема (0,1 мл) стандартной взвеси бактерий, приготовленной из суточной агаровой культуры.

После засева пробирки ставились на полтора часа в термостат для того, чтобы латентная фаза развития культуры происходила в пробирке и перенос под микроскоп имел бы место в фазе логарифмического ускорения роста.

Для микроскопического наблюдения размножения были отобраны обычные предметные стекла для висячей капли с глубокой лункой. Препараты-культуры готовились так же как и обыкновенные препараты висячей капли, с той лишь разницей, что капля бралась возможно побольше, а для создания необходимого герметизма края покровного стекла покрывались парафином. Весь процесс приготовления препарата-культуры длился не больше двух минут. Готовый препарат сразу же ставился на нагревательный столик микроскопа.

В препарате подыскивалось поле зрения, содержащее 2—3 бактерии. Обычно к моменту, когда начиналось первое деление, токи жидкости, вызванные манипуляцией установки препарата, прекращались и становилось возможным начать наблюдение. Зафиксировав время первого деления бактерий (момент образования двух новых особей), мы отсчитывали число минут до последующих делений особей первого поколения, а в дальнейшем и их потомства, до тех пор пока было возможно вести наблюдение, не путая клеток в данном поле зрения. Бактерия считалась разделившейся с того момента, когда при суженной диафрагме микроскопа становился заметным перехват, отделяющий дочерние особи. Для выведения среднего времени генерации в 3—4 полях зрения наблюдалось 30 клеточных делений (в первых опытах по 50 делений) и вычислялось среднее арифметическое из не слишком разнящихся чисел.

Каждый опыт с данным штаммом и эмбриональным экстрактом сопровождался контрольными опытами, в которых

применялась синтетическая среда без прибавления экстракта и мясо-пептонный бульон.

Результаты опытов

Действие эмбрионального экстракта было испытано на культурах белого и золотистого стафилококков, крупного неидентифицированного кокка и сибиреязвенной палочки. Все культуры перед их использованием в опытах были очищены от возможного загрязнения методом последовательного десятикратного пересева из отдельных колоний на чашках Петри.

В таблице 1 сведены результаты опытов со всеми культурами. В ней приведены как среднее время генерации в мину-

Таблица 1
Время генерации в различных средах (в минутах)

Культура	Синтетическая среда				Синтетическая среда, содержащая 0,1% эмбрионального экстракта				Мясо-пептонный бульон			
	минимальное	максимальное	среднее	коэффициент	минимальное	максимальное	среднее	коэффициент	минимальное	максимальное	среднее	коэффициент
Золотистый стафилококк	39	55	45,1	1	19	31	25,6	1,75	17	39	24	1,88
Белый стафилококк	17	33	24,8	1	13	29	18,8	1,32	14	22	17,4	1,43
Сибиреязвенная палочка	47	68	54,2	1	33	45	40,2	1,35	27	48	40,5	1,34
Неидентифицированный крупный кокк	53	67	64,5	1	51	64	55,9	1,15	31	51	39,2	1,64

тах, так и минимальное и максимальное время генерации, отмеченное в данном опыте. Кроме того, желая в цифрах выразить эффект стимуляции, мы даем «коэффициент» стимуляции, который представляет отношение среднего времени генерации в данной среде к среднему времени генерации в питательном растворе Френкеля.

Как видно, минимальное, максимальное и среднее время генерации всех четырех культур в синтетической среде, не содержащей эмбрионального экстракта, превышает соответствующие показатели той же культуры в синтетической среде после добавления к ней эмбрионального экстракта. Время генерации в синтетической среде, содержащей 0,1% экстракта, приближается к цифрам, выражающим время генерации культуры в мясо-пептонном бульоне. Это указывает на стимулирующее размножение влияние эмбрионального экстракта на испытанные нами штаммы различных бактерий, ибо трудно предполагать, что добавление 0,1% экстракта, содержащего растворимые вещества, имевшиеся в десять раз меньшем количестве эмбриональных тканей, может сколь-нибудь заметно изменить питательность среды.

Следует также отметить, что наибольший эффект стимуляции замечен в культурах золотистого стафилококка, а наименьший—в культуре сапрофитного крупного кокка.

Золотистый стафилококк и сибиреязвенная палочка в мясо-пептонном бульоне дали несколько большее максимальное время генерации, чем в синтетической среде с эмбриональным экстрактом. Однако среднее время генерации культуры в мясо-пептонном бульоне меньше, чем в двух других средах. Это следует объяснить тем, что бульон, помимо веществ, стимулирующих размножение бактерий, содержит также и питательные вещества, которые как по своим качествам, так и по количеству, более благоприятствуют росту и «созреванию» бактерий, чем вещества, имеющиеся во френкелевском питательном растворе. Возможно, что этим последним обстоятельством обусловлено также и то, что сапрофитный кокк, имеющий наибольшее среднее время генерации во всех трех средах, нуждаясь в большем количестве питательных и стимулирующих веществ, по величине «коэффициента стимуляции» занимает не последнее, а второе место. Сибиреязвенная палочка в мясо-пептонном бульоне имеет почти такое же среднее время генерации как и в синтетической среде с прибавлением эмбрионального экстракта, благодаря чему для этой палочки «коэффициенты стимуляции» обеих сред почти равны.

Таким образом, полученные нами данные не оставляют места сомнениям относительно положительного влияния эмбрионального экстракта на размножение стафилококков, сибиреязвенной палочки и использованного в опытах сапрофитного кокка. Величина среднего времени генерации в фазе логарифмического ускорения является лучшим критерием, определяющим наличие в среде условий, необходимых для развития бактериальной культуры. Укорочение среднего времени генерации в среде, содержащей эмбриональный экстракт, указывает на наличие в нем ростовых веществ, необходимых для развития и размножения бактерий.

Для сравнения полученных нами в отношении стафилококков данных с соответствующими данными других авторов в таблице 2 приводятся цифры, выражающие среднее время

Таблица 2

Среднее время генерации стафилококков

Вид стафилококка	Среда	Среднее время генерации (минуты)	Автор
Золотистый стафилококк	Вульон . .	27	Graham-Smith (1922)
Золотистый стафилококк	Бульон . .	30	Barnes (1925)
Золотистый стафилококк	Глюкозный бульон . .	32	Mason (1935)
Белый стафилококк . .	"	24—25	Mason (1935)
Золотистый стафилококк	Мясо-пептонный бульон . .	24	Наши данные
Белый стафилококк . .	"	17	Наши данные

генерации этого же микроба. Здесь уместно отметить, что заимствованные нами из литературы данные получены различными авторами в опытах с применением метода высева. Как видно, наши данные, полученные в опытах выращивания бактерий в висячей капле, мало отличаются от данных исследователей, цитированных в таблице. Это показывает, что примененный нами метод непосредственного наблюдения за размноже-

нием бактерий является вполне пригодным для разрешения поставленной нами задачи.

В наших опытах, также как и в опытах авторов, результаты исследования которых приведены в таблице 2, белый стафилококк имеет более короткое среднее время генерации, чем золотистый стафилококк. Вместе с тем, обращает на себя внимание и то, что в наших опытах для обоих видов стафилококков было найдено несколько более короткое среднее время генерации, чем у других авторов. Возможно, что причиной тому является разница в использованных штаммах бактерий и средах.

Как указывалось, мы использовали в работе только одну концентрацию эмбрионального экстракта. Можно предполагать, что эта концентрация (0,1%) не является максимально стимулирующей. Возможно также, что такого же эффекта стимуляции можно было достичь и при более низких концентрациях эмбрионального экстракта в питательном растворе.

В стимулирующем действии экстракта мы сумели убедиться также и на основании следующего наблюдения. После неудачных попыток получить свежую культуру дизентерийной палочки из материала, взятого из старой культуры того же штамма на косом агаре, высохшая старая культура была залита бульоном и поставлена в термостат для «оживления». Безрезультатной оказалась и эта попытка. Восьмидневное выдерживание пробирки со старым посевом не дало роста дизентерийной палочки в бульоне. Однако через 24 часа после добавления к тому же бульону нескольких капель эмбрионального экстракта был получен рост дизентерийной культуры, откуда она была пересеяна на косой агар и дала нормальный рост.

В ы в о д ы

1. Профильтрованный экстракт из эмбриональных тканей стимулирует размножение бактерий и укорачивает среднее время их генерации.

2. Добавление 0,1% эмбрионального экстракта к синтетической среде Френкеля делает последнюю почти равноценной мясо-пептонному бульону.

3. Среднее время генерации бактерий может быть выведено непосредственным микроскопическим наблюдением на нагревательном столике.

Кафедра микробиологии
Ереванского медицинского
института

Լ Ի Թ Ե Դ Ա Դ Ր Ա

- Barnes L. N.* 1925. Dormancy of Bacteria. J. Inf. Dis., 36, p. 555.
Mason M. M. 1935. A Comparison of the Maximal Growth Rates of various Bacteria Under Optimal Conditions. J. of Bact., 29, p. 103.

Բ. Գ. ԱՎԵՏԻՍՅԱՆ

ԷՄԲՐԻՈՆԱԼ ԷՔՍՏՐԱԿՏԸ ՈՐՊԵՍ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԲԱԶՄԱՑՄԱՆ ԽԹԱՆԻՉ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Արդի բիոլոգիայի ակտուալ պրոբլեմներից մեկը աճման գործոնների պրոբլեմն է: Հայտնի է, որ բազմաթիվ տեսակի բակտերիաներ ընդունակ են արտադրելու իրենց աճման համար անհրաժեշտ քիմիական նյութեր: Պաթոգեն բակտերիաների աճման գործոնները մինչև այժմ լավ ուսումնասիրված չեն: Բոլորովին ուսումնասիրված չէ այն հարցը, թե երիտասարդ կենդանիների հյուսվածքներում գտնվող նյութերն ինչպես են ազդում բակտերիաների աճման վրա:

Այս հարցը լուծելու նպատակով կատարված փորձերը ցույց են տալիս, որ էմբրիոններից պատրաստված էքստրակտները խթանում են բակտերիաների բազմացումը:

Փորձերը դրվել են սիբիրյան խոցի ցուպիկի, սպիտակ և ոսկեգույն ստաֆիլոկոկների և սապրոֆիտային խոշոր կոկկի կուլտուրաների վրա: Աճման խթանումը պարզելու համար այս միկրոբների աճումը դիտվել է միկրոսկոպի տաքացվող առարկայասեղանների վրա՝ կախ կաթիլի մեջ: Կոնտրոլ փորձերում, որպես սննդամիջավայր, օգտագործվել են Ֆրենկելի սննդային լուծույթը և սովորական մսապահպտոնային բուլյոնը: Հիմնական փորձերում Ֆրենկելի

սննդային լուծույթին ավելացվել է հալի էմբրիոններից ստացված էքստրակտը, որի կոնցենտրացիան կախ կաթիլի մեջ եղել է 1:1000:

Բակտերիաների գեներացիայի միջին ժամանակը պարզելու համար յուրաքանչյուր փորձում միկրոսկոպի տակ դիտվել է 30—50 անհատ բակտերիաների բազմացումը:

Փորձերի արդյունքները ցույց են տալիս, որ հալի էմբրիոններից ստացված էքստրակտի շնչին կոնցենտրացիաները խթանում են բակտերիաների բազմացումը: Նկարագրված փորձերի պայմաններում նշված միկրոբների բազմացումը Ֆրենկելի լուծույթում էմբրիոնալ էքստրակտի ներկայությամբ ընթանում է մոտավորապես նույն տեմպով, ինչ տեմպով և սովորական մսապատրոնային բուլյոնում:

Մսապատրոնային բուլյոնում գեներացիայի միջին ժամանակին վերաբերող մեր ստացած տվյալները համընկնում են դրականությոնից հայտնի տվյալների հետ:

Սա ցույց է տալիս, որ փորձերի ընթացքում գործադրված մեթոդը (բազմացման անմիջական դիտումը միկրոսկոպի տակ) կարող է, անհրաժեշտության դեպքում, կիրառվել բակտերիաների բազմացումն ուսումնասիրելու համար: