

ЭПИЗООТОЛОГИЯ

М. М. АГАБАБЯН

ПОЛУЧЕНИЕ РАДИОАКТИВНЫХ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ
БАЦИЛЛ

(Сообщение первое)

За последние годы радиоактивные изотопы широко применяются в биологии, медицине и ветеринарии. Изотопы, как индикаторы, используются для изучения механизма обменных процессов в организме.

Задачей данной работы было установление условий получения высокорadioактивных сибиреязвенных бацилл.

Ниже описываются некоторые результаты проведенных нами работ: а) по изысканию специфической питательной среды для выращивания *Bac. anthracis*; б) по выяснению закономерности поглощения радиосеры бациллами сибирской язвы в зависимости от различных концентраций радиоактивной серы в среде и в) по получению максимального роста культуры и повышению поглощаемости радиосеры бациллами сибирской язвы.

Для получения радиоактивных бацилл использована меченая сера в виде метионина.

Учитывая то обстоятельство, что при выращивании бактерии на обыкновенных питательных средах, содержащих нерадиоактивную серу, и при добавлении радиосеры поглощение последней микробами из питательной среды бывает весьма незначительным, поэтому для получения микробов с наибольшей радиоактивностью необходимо было изыскать такую питательную среду, которая не содержала в себе серы или содержала в минимальном количестве. Для этой цели были испытаны различные синтетические питательные среды.

В начале наших исследований изучался рост *Bac. anthracis* на двух синтетических средах: Строгова и Львова. В состав среды Львова входит сернокислый магний, и для того, чтобы в питательной среде радиоактивная сера оказалась бы единственным источником для микроорганизмов, то вместо сернокислого магния введен хлористый магний.

В обеих синтетических средах исходный pH—7,2. Указанные среды разливались в пробирки и сквашивались. Для контроля использован обычный мясопептонный агар. Культура выращивалась в термостате при 36—37°. Проверка роста производилась через 24 и 48 часов.

Рост сибиреязвенных бацилл на синтетических средах как через 24, так и через 48 часов оказался скудным или весьма скудным, а концентрация микробных тел в 1 мл, по сравнению с культурой, выращенной на мясопептонном агаре, была в 8—10 раз слабее. Поэтому указанные выше две синтетические среды оказались непригодными для

наших работ. От использования мясопептонного агара мы отказались ввиду того, что в такой среде не исключаются наличия органических соединений серы.

Исходя из этого, мы остановились на среде с другим составом: пептон—1 г, глицерин—4 мл, хлористый натр—0,5 г, агар-агар—2,5 г и дистиллированная вода—100 мл. Такой состав среды был избран ввиду того, что пептон содержит большое количество высокомолекулярных продуктов распада белков и хорошо утилизируется микроорганизмами, а в качестве источника углерода и энергии для микробов включили глицерин.

Сравнительное исследование глицерино-пептонного и мясопептонного агара на рост сибиреязвенных бацилл показало, что наиболее подходящей средой для выращивания *Bac. anthracis* является глицерино-пептонный агар.

В дальнейших наших исследованиях большой интерес представлял вопрос о степени поглощения радиоактивной серы бациллами сибирской язвы, т. е. какой процент радиосеры, введенный в среду, перейдет в микроорганизмы.

Меченые сибиреязвенные бациллы получались путем выращивания *Bac. anthracis* (штамм № 574) на скошенном в пробирках глицерино-пептонном агаре (рН—7,2—7,4), к которому добавлялись различные количества радиоактивной серы в виде метионина.

После одностуточного выдерживания посева в термостате, микробы смывались с агара физиологическим раствором и 5 раз, промывались путем центрифугирования, для освобождения адсорбированной на микробных телах радиосеры. После центрифугирования по стандарту мутности устанавливалась концентрация микробных тел в 1 мл и определялась радиоактивность этой взвеси в 0,1 мл при помощи торцового счетчика.

В табл. 3 представлены результаты, полученные при выращивании сибиреязвенных бацилл на глицерино-пептонном агаре, содержащем различные количества радиосеры.

Таблица 1

Количество микрокюри, введенных на 1 мл питательной среды	Получено в 1 мл питательной среды		Общий процент поглощения радиосеры бациллами
	бактериальных тел в мл.	микрокюри в бактериях	
2,75	850	0,026	0,9
5,5	900	0,114	2,1
11	800	0,143	1,3
22	700	0,152	0,7

Из табл. 1 видно, что при двух и четырехкратном увеличении концентрации радиосеры в среде общий процент поглощения радиоактивного вещества бациллами соответственно не увеличивается. Ре-

зультаты нашего опыта показывают, что при добавлении на 1 мл питательной среды 5,5 микрокури радиосеры общий процент поглощения равен 2,1, при уменьшении концентрации меченого сульфата в питательной среде поглощение радиоизотопа микробами уменьшается (0,9%), а при ее увеличении — процент поглощения также снижается (1,3—0,7). В данном случае оптимальная концентрация радиоактивной серы равняется 5,5 микрокури на 1 мл питательной среды. Это количество радиосеры, в дальнейшем, нами было использовано для получения меченых сибиреязвенных бацилл.

Таким образом, при рассмотрении этих данных не было обнаружено пропорциональной закономерности одновременного увеличения концентрации радиоактивного вещества в среде и увеличения общего процента поглощения радиосеры бактериями.

Следует отметить, что при промывке адсорбированной на микробных телах радиосеры, путем центрифугирования, первая и вторая промывные воды обнаружили довольно высокую радиоактивность, тогда как последняя промывная вода (пятая) давала значительное снижение радиоактивности и в промывной воде отмечалась только весьма слабая радиоактивность. Кроме того, был поставлен отдельный опыт по изучению радиоактивности сибиреязвенных бацилл при различных сроках выращивания (через 24 и 48 часов). В результате проведенного эксперимента, особой разницы в радиоактивности бацилл сибирской язвы в 1 мл микробной суспензии при 1 млрд-ной концентрации, при культивировании в течение 24 часов или 48 часов мы не нашли.

В дальнейших наших исследованиях мы старались выяснить поглощаемость радиосеры бациллами сибирской язвы. М. Я. Корн [6], при получении меченых дизентерийных бактерий ч Н. П. Илюгников [7] при выращивании бруцелл на радиоактивных питательных средах отмечают, что степень поглощения радиофосфора сильно связана с интенсивностью роста микробов.

Нам необходимо было изыскать такие вещества, которые после добавления к питательной среде могли бы заметно усиливать размножение микробов. К таким веществам мы отнесли витамины. Значение витаминов для жизнедеятельности микроорганизмов огромное. Известно, что многие витамины синтезируются микроорганизмами, но есть другая группа микроорганизмов, которые нуждаются в готовых витаминах.

Витамин В₆ (пиридоксин) необходим для роста корней некоторых видов растений, а также для жизнедеятельности некоторых бактерий, дрожжей и плесневых грибов, для которых он является ростовым фактором.

По данным В. А. Девятинина [3], бактерии молочно-кислого брожения на средах, не содержащих пиридоксина, развиваются крайне медленно и слабо; добавление этого витамина даже в разведениях 0,00005% оказывает поразительное действие на рост бактерий. Подоб-

ные сообщения автор приводит из других источников, когда различные витамины В, в том числе и пиридоксин, при применении в питательных средах оказывают резко выраженное влияние на рост стафилококков.

В. Н. Букин с сотрудниками [1] отмечают, что первичный синтез витамина В₁₂ в природе осуществляется микроорганизмами. К витамину В₁₂ чувствительным является *Echerichia coli*. Учитывая такую способность *Bact. coli*, этот микроб используется для определения витамина В₁₂ — микробиологическим методом.

Р. Д. Гальцова [2], изучая влияние витаминов на биосинтетические процессы у дрожжей, выросших на радиоактивной питательной среде, обнаружила, что поглощаемость меченого сульфата дрожжевыми клетками повышается при добавлении в питательную среду нескольких витаминов (пиридоксин, биотин, тиамин и др.).

Исходя из этих данных, для получения максимального роста культуры сибирской язвы и для повышения поглощаемости радиосеры мы использовали витамины В₆, В₁₂, и оба витамина одновременно. В качестве питательной среды применялся описанный выше глицерино-пептонный агар с добавлением радиоактивной серы в виде метионина по 5,5 микроюри на 1 мл среды.

Витамины в наше распоряжение были любезно предоставлены проф. Э. А. Давтяном.

Витамин В₆ к питательной среде добавлялся в количестве 0,5 мг на 100 мл среды. Такую дозу мы выбрали, исходя из полученных Р. Д. Гальцовой данных.

Витамин В₁₂ использовался в виде водного раствора, в 1 мл которого содержится 30 микрограмм. Такое количество витамина В₁₂ добавлялось на 100 мл радиоактивной питательной среды. В третью среду одновременно добавлялись витамины В₆ и В₁₂ в половинных дозах. Среда, содержащая витамины, стерилизовалась в автоклаве при 0,5 атм в течение 20 минут. Исходный pH = 7,2. В качестве контроля применялась радиоактивная питательная среда без витаминов. Засеянные пробирки ставились в термостат при 36—37° на 24 часа. Затем готовилась бактериальная суспензия, устанавливалась концентрация микробных тел в 1 мл и микробные тела подвергались промывке путем центрифугирования, после чего определялась активность этой взвеси в 0,1 мл торцовым счетчиком.

Из приведенных данных видно, что при добавлении к питательной среде, содержащей радиосеру, витамина В₆, с увеличением роста микробных тел увеличивается и поглощаемость радиоактивной серы до 40%. При добавлении витамина В₁₂ поглощение сульфата увеличивается на 30%. При одновременном добавлении в питательную среду витаминов В₆ и В₁₂ рост сибиреязвенной культуры значительно увеличивается, при этом количество микробных тел в 1 мл питательной среды доходит с 0,8 до 1,4 млрд. и наблюдается одновременное уве-

личение радиосеры. В этом случае радиоактивность сибиреязвенных бактерий увеличивается на 80%.

Таблица 2

Поглощение радиоактивной серы бактериями сибирской язвы, культивированных на питательных средах с витаминами

Питательная среда с витаминами	Количество микрокури, введенных на 1 мл питательной среды	Получено в 1 мл питательной среды		Общий процент поглощения радиосеры бактериями	Процент повышения поглощаемости радиосеры
		бактериальных тел в млрд	микрокури в бактериях		
Витамин B ₆	5,5	1,1	0,152	2,8	140
Витамин B ₁₂	5,5	1,2	0,165	3,0	150
Витамин B ₆ +B ₁₂	5,5	1,4	0,195	3,6	180
Без витаминов	5,5	0,8	0,110	2,0	100

В ы в о д ы

1. Для выращивания сибиреязвенных бактерий нам удалось изготовить специальную питательную среду, не содержащую серу. Такой средой является глицерино-пептонный агар.

2. При выращивании *Bac. anthracis* на глицерино-пептонном агаре, содержащем радиоактивную серу в виде метионина, бактерии становились мечеными, так как поглощали радиосеру.

3. При увеличении концентрации радиоактивного вещества, пропорциональной закономерности в среде не было обнаружено в отношении увеличения общего процента поглощения радиосеры бактериями.

4. Оптимальной концентрацией радиосеры в питательной среде для выращивания *Bac. anthracis* является 5,5 микрокури на 1 мл среды.

5. При добавлении к питательной среде, содержащей радиоактивную серу, витамина B₆ увеличивается рост микробных тел и соответственно увеличивается их радиоактивность на 40%. При добавлении витамина B₁₂ поглощение сульфата увеличивается на 50%.

При одновременном добавлении к питательной среде витаминов B₆ и B₁₂ радиоактивность сибиреязвенных бактерий увеличивается, по сравнению со средой без витаминов, на 80%.

Кафедра эпизоотологии

Ереванского зооветеринарного института

Поступило 6. II 1958 г.

Մ. Մ. ԱՂԱՐՔՅԱՆ

ՄԻԻԲԱՆՏԻ ՌԱԴԻՈԱԿՏԻՎ ԲԱՅԻԼՆԵՐԻ ՍՏԱՅՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Միկրոբիոլոգիայում և իմունոբիոլոգիայում ապրիտակալի իզոտոպներն օգտագործվում են օրգանիզմում բակտերիաների ու նրանց տոքսինների տարածվածության ուսումնասիրելու, ինչպես և ներարկած ապրիտակալի նյութերի արտադրաման տվյալները պարզաբանելու համար:

Այս աշխատության նպատակն է պարզել, թե ինչպիսի՝ պայմաններում կարելի է ստանալ բարձր ռադիոակտիվ հատկություններ ունեցող սիրիբախտի բացիլներ:

Մեր ստացած տվյալները հիմք են ստիպ սնելու հետևյալ եզրակացությունները.

1. Սիրիբախտի բացիլներն աճեցնելու համար պետք է օդաազոծել ծածուժը չպարունակող հատուկ սննդամիջավայր: Այլպիսի միջավայր է գլիցերին-պեպտոնային աղարը:

2. Սիրիբախտի բացիլները դառնում են նշված (ռադիոակտիվ), երբ նրանք աճեցվում են ռադիոակտիվ ծածուժը պարունակող գլիցերին-պեպտոնային աղարի վրա:

3. Սննդամիջավայրում ռադիոակտիվ ծածուժի կոնցենտրացիան ավելացնելու դեպքում բացիլների կողմից ալդ նյութի ընդհանուր տոկոսային կլանման համեմատական ավելացում չի նկատվում:

4. Սիրիբախտի միկրոդրներն աճեցնելու համար ռադիոակտիվ ծածուժի օդառիմալ կոնցենտրացիան 1 մլ սննդամիջավայրում պետք է լինի 5,5 միկրոկուրի:

5. Ռադիոակտիվ ծածուժը պարունակող միջավայրին վիտամին B₆ ավելացնելու դեպքում միկրոդրների աճը մեծանում է և համապատասխանորեն բարձրանում է ռադիոակտիվությունը 40%-ով: Վիտամին E₁₂ ավելացնելու դեպքում սուլֆատի կլանումը բակտերիաների կողմից ավելանում է 50%-ով: Սննդամիջավայրին միաժամանակ վիտամին B₆ և B₁₂ ավելացնելու դեպքում սիրիբախտի բացիլների ռադիոակտիվությունը, համեմատած վիտամին չպարունակող միջավայրի հետ, բարձրանում է 80%-ով:

ЛИТЕРАТУРА

1. Букин В. Н., Арешкина Л. Я. и Куцева Л. С., Жур. Успехи современной биологии, т. 40, вып. 3, стр. 269, 1955.
2. Гальцова Р. Д., Изотопы в микробиологии. Изд. Академии наук СССР, стр. 113, 1955.
3. Девятинни В. А., Витамины, Пищепромиздат, глава IV - Витамины B₆, 1943.
4. Кальмет А., Негр Л. и Бокэ А., Руководство по микробиологической и серологической технике, Биомедгиз, стр. 79, 1937.
5. Кови, Болтон и Сэнде, Сборник сокращенных переводов и обзоров иностранной периодической литературы, Действие излучений и применение изотопов в биологии, 3, стр. 121, 1952.
6. Корн М. Я., Труды по применению радиоактивных изотопов в медицине, Медгиз, стр. 135, 1953.
7. Плотников Н. П., Изотопы в микробиологии. Изд. Академии наук СССР, стр. 19, 1955.
8. Строгов А. К., Журн. Лабораторная практика, 1, стр. 7, 1941.