

Из Кафедры микробиологии Военно-медицинской академии
(нач. кафедры проф. В. М. Аристовский).

К методике выращивания анаэробных культур.

А. И. Панина.

Методика выращивания анаэробов еще недостаточно разработана. Предложен ряд эмпирических способов, дающих отличный результат при выращивании того или иного возбудителя; но пользование этими способами часто затруднительно, ввиду их сложности, а кроме того факторы, способствующие росту, при применении той или иной методики, недостаточно выяснены.

Присутствие кислорода в средах является губительным для анаэробной культуры. Это было доказано еще Пастером в его опытах с *v. Butyrique* — пропускание воздуха через культуру в течение часа убивало ее. Хуляков показал, что разные анаэробы отличаются своей чувствительностью к кислороду. Масляно-кислые бактерии растут при 5—10 мм. давления кислорода, *b. tetani* 10—20 мм. *b. chauvei* 40 мм. *b. Welchii* 200 мм. атмосферного давления и т. д. Присутствие кислорода влияет на окислительно-восстановительный потенциал питательной среды, роль которого, как важного фактора для роста анаэробов, установлена в последнее время. Кислород, являясь сильным окислителем, влияет на редуцирующую способность питательной среды, изменяя ее в сторону снижения. Mc.Leod и Gordonn считают, что токсичным для анаэробов является не кислород, а образующаяся в его присутствии перекись водорода H_2O_2 .

Анаэробы, лишённые каталазы, погибают под действием образующейся перекиси водорода. Эта теория, не получившая общего признания, давая объяснение токсичности кислорода для анаэробов (как источника появления H_2O_2), ясно показывает необходимость удаления кислорода из сред для роста анаэробов, что лежит в основе методики выращивания анаэробов.

Со времени Тароцци (1905 г.) ряд авторов предлагал способы выращивания анаэробов в жидких средах, ничем не огражденных от атмосферного кислорода, основанные на поглощении кислорода в самой среде или основанные на принципе разрушения образующейся H_2O_2 . Но вопрос о способах выращивания анаэробов связан не только с наличием кислорода в среде — здесь играют роль и другие факторы.

Установлено, что для роста анаэробов нужно сочетание следующих условий: 1) наличие в среде достаточного количества питательных веществ, необходимых для развития бактериальной клетки, 2) удаление кислорода, присутствие которого губительно отражается на анаэробах (для различных анаэробов чувствительность к кислороду колеблется), 3) в последнее время установлено важное значение окислительно-восстановительного потенциала среды.

Нашей задачей было выяснить, в какой степени применяемые для выращивания анаэробов методы влияют на содержание кислорода в средах и отсюда — на рост микробов. Несомненно, что различные методы созда-

вия анаэробнозиса отражаются и на других вышеупомянутых факторах, но, чтобы подойти к разрешению всей проблемы анаэробнозиса в целом, следует изучить влияние каждого фактора раздельно, и в частности, как меняется при различных методах выращивания такой важный фактор, как присутствие свободного кислорода.

Для определения свободного кислорода в среде мы пользовались способом Хлопина-Винклера¹⁾.

Среда бралась в объеме 10 куб. см., поэтому естественно, что точность результатов по сравнению с обычными исследованиями кислорода по Винклеру, где жидкость берется в объеме 150—300 куб. см., ниже. Кроме того, способ Винклера предназначен для определения кислорода в питьевых водах, а не в питательных средах, что также необходимо иметь ввиду при оценке результатов. Тем не менее, на сравнительной оценке полученных данных это не сильно отразилось, и установленные закономерности восстанавливающей способности питательной среды надо считать правильными.

Каждое исследование производилось в трех пробирках, результаты исследования, как правило, незначительно колебались в пределах 10—20%. Среднее из трех данных бралось в качестве итога опыта.

Таким образом были проведены следующие способы создания анаэробнозиса: выяснялось влияние различных адсорбентов, влияние заливки различными маслами и, наконец, влияние некоторых восстановителей на содержание кислорода в среде.

При испытании адсорбентов, пробирки с 10 куб. см. физиологического раствора в помещенными туда кусочками адсорбентов прогревались в водяной бане при 100° 15 минут, заливались слоем вазелинового масла высотой в 2 куб. см. и выдерживались в термостате 24—48—72 часа; по истечении каждого срока устанавливалось наличие кислорода по методу Винклера.

Результаты исследования приводим в таблице.

Таблица 1.

Влияние адсорбентов на содержание кислорода.

Адсорбенты в физ. растворе	Термостат 37°		
	24 ч.	48 ч.	72 ч.
Печень	0,0096	0,0096	0,0008
Белок куриный	0,0152	0,0133	0,004
Сукно	0,0104	0,0104	0,0104
Вата	0,0224	0,0216	0,0176
Древ. уголь в порошок	0,0096	0,0064	0,0064
Древ. уголь в кусках	0,0128	0,0144	0,016
Животн. уголь в порошок	0,0136	0,0104	0,0186
Физиол. раств. без адсорбента	0,0248	0,0248	0,0248

Эти опыты показали, что из примененных адсорбентов лучшими являются печень и древесный уголь в порошок. Большая часть адсорбентов, при длительном выдерживании пробирок в термостате, связывает свободный кислород и таким образом уменьшает содержание его в среде.

¹⁾ Хлопин. Методы санитарных исследований.

Подобным же образом определялось влияние на содержание кислорода заливки различными маслами, с той лишь разницей, что в пробирки с физ. раствором не добавлялись адсорбенты. Соответствующие опыты показаны в нижеприведенной таблице.

Таблица 2.

Влияние на присутствие кислорода заливки различными маслами.

10 куб. см. физ. раствора	Термостат 37°		
	24 ч.	48 ч.	72 ч.
Вазелин белый	0,0064	0,0064	0,008
Вазелин желтый	0,004	0,004	0,0052
Вазелиновое масло	0,0064	0,008	0,0093
Дельфиний жир	0,0024	0,0024	0,004
Рыбий жир	0,0016	0,0016	0,0016
Льняное масло	0,0068	0,0068	0,0008
Физ. раствор не залитый	0,0096	0,0096	0,012

Из таблицы ясно видно, что заливка растительными маслами создает лучшие условия анаэробноза, чем минеральными. Есть основание думать, что эти „хранители“ анаэробноза не только механически задерживают проникновение кислорода в среду, но и поглощают его, окисляясь соприкасающимися с ними воздухом. Эта способность окисления, как известно, наиболее резко выражена у льняного масла, следствием чего является его преимущество перед другими маслами, в особенности минеральными.

По сравнению с другими маслами растительного и животного происхождения льняное масло значительно богаче содержанием жирных кислот, высокой степени непредельности, в особенности липоеновой, и поэтому оно характеризуется и наиболее высоким иодным числом (192). Отсюда у льняного масла способность поглощать кислород в присутствии воздуха выражена чрезвычайно резко.

Обычно применяемое в анаэробной практике вазелиновое масло предохраняет среду от доступа кислорода значительно хуже, чем вазелин. По-видимому, проникновение в среду свободного кислорода совершается здесь значительно легче. Эти данные подтверждают исследования R u n e b e r g'a и H a l l относительно непригодности минеральных масел, в качестве „хранителей“ анаэробноза.

Обыкновенно с проверкой упомянутых способов создания анаэробноза было испытано влияние на содержание кислорода в физрастворе и бульона восстановителя — гидросульфита натрия и фильтрата *b. mesentericus*, которому также некоторые авторы приписывают восстанавливающие свойства.

С этой целью к 10 куб. см. физ. раствора и такому же количеству бульона прибавлялась 1 капля гидросульфита различной концентрации, пробирки закрывались вазелином и помещались в термостат на 24—48—72 часа, после чего вышеупомянутой методикой определялось содержание кислорода.

Таблица 3 показывает, что крепкий раствор гидросульфита натрия, добавленный к питательной среде в минимальном количестве, является отличным восстановителем, освобождая питательную среду полностью от присутствия кислорода.

Таблица 3.

Влияние гидросульфита натрия на содержание в питат. среде кислорода.

Среда 10 кб. см.	Гидросульфит натрия	Термостат 37°		
		24 ч.	48 ч.	72 ч.
Физ. раств.	Капля 1%	0	0	0,008
Бульон	"	0,0032	0,0032	0,0032
Физ. раств.	" 5%	0	0	0
Бульон	"	0	0	0
Физ. раств.	" 10%	0	0	0
Бульон	"	0	0	0
Физ. раств.	Без гидрос. натрия	0,008	0,008	0,008
Бульон	"	0,004	0,004	0,004

Наличие же кислорода в бульоне при добавлении 1% гидросульфита показывает, что одной капли такого раствора недостаточно для удаления кислорода, находящегося в питат. среде в связанном состоянии; для его удаления требуется большее количество восстановителя.

Аналогичный опыт был поставлен и с фильтратом *b. mesentericus*, с той лишь разницей, что к физ. раствору и бульону были добавлены несколько большие количества, а именно 0,25—0,5—1,0 кб. см.

Таблица 4.

Испытание восстанавливающей способности фильтрата *b. mesentericus*.

Среда 10,0 кб. см.	Фильтрат	Термостат		
		24 ч.	48 ч.	72
Физ. раств.	0,25 к. с.	0,0064	0,0064	0,0064
Бульон	"	0,0024	0,0024	0,0024
Физ. раств.	0,5 к. с.	0,0064	0,0056	0,0064
Бульон	"	0,0016	0,0016	0,0016
Физ. раств.	1 к. с.	0,0004	0,0008	0,0008
Бульон	"	0	0	0
Физ. раств.	В/фильтрата	0,0128	0,0144	0,0144
Бульон	"	0,0016	0,0016	0,0016

Восстанавливающая способность фильтрата *b. mesentericus* слаба, в смеси с бульоном она дает лучший эффект, чем с физ. раствором. Для освобождения питательной среды от кислорода, а следовательно для создания лучших условий анаэробноз, необходимо добавление больших количеств фильтрата. Это в свою очередь может оказаться тормозом в развитии анаэробной культуры, несмотря на отсутствие в питат. среде кислорода, ввиду того, что фильтрат содержит в себе продукты обмена, могущие гибельно влиять на размножение бактериальной клетки. В этом мы и убедились при дальнейших опытах, которые были направлены к выяснению роли адсорбирующих веществ и способов заливки в процессе выращивания анаэробной культуры.

Для проверки данных, полученных по способу Винклера, мы посеяли культуры облигатных анаэробов *b. tetani* и *b. botulinus* в одинаковое по объему количество обычного сл. щел. бульона с добавлением к нему восстановителей и различных адсорбирующих веществ, преграждая

доступ кислорода растительными и минеральными маслами. В качестве контроля одну пробирку оставляли незакрытой.

Посевы в пробирках с гидросульфитом натрия и фильтратом *b. mesentericus* заливались только вазелином. Результаты проверочного опыта суммируем в нижеприводимой таблице.

Таблица 5.

10 куб. см. бульона	Заливка	B. tetani		B. botulinus	
		24 ч.	48 ч.	24 ч.	48 ч.
Капля 10% гидрос. натр.	Вазелин	+++ ¹⁾	+++	+++	+++
	В/вазелина	+	+	++	+++
Капля 5% гидрос. натр.	Вазелин	+++	+++	+++	+++
	В/вазелина	—	—	—	—
Капля 1% гидрос. натр.	Вазелин	—	—	+	++
	В/вазелина	—	—	—	—
Фильтрат <i>b. mesentericus</i> 1 к.с.	Вазелин	—	—	—	—
	В/вазелина	—	—	—	—
Печень	Льн. масло	+++	+++	+++	+++
	Вазелин	+++	+++	++	+++
	Ваз. масло	+	++	++	++
	В/заливки	—	—	—	—
Белок кур.	Льн. масло	—	++	—	+
	Вазелин	—	+	—	—
	Ваз. масло	—	—	—	—
	В/заливки	—	—	—	—
Сукно	Льн. масло	—	+	—	++
	Вазелин	—	—	—	+
	Ваз. масло	—	—	—	—
	В/заливки	—	—	—	—

Из таблицы видно, что добавление к питательной среде гидросульфата натрия, печени и заливка льняным маслом дают наилучший эффект при выращивании анаэробов, и если считать, что рост анаэробных культур зависит от степени достигнутого в среде анаэробноза, то приведенные в таблице данные посевов *b. tetani* и *b. botulin* подтверждают наши исследования, проведенные по способу Винклера.

Выводы. 1) В присутствии одной капли 10% гидросульфата натрия получается хороший рост анаэробов даже без преграждения доступа кислорода.

2) Льняное масло является лучшим „хранителем“ анаэробноза.

+++ — рост обильный.
 ++ — „ ясный.
 + — „ слабый.
 — — „ отсутствует.