

## К биологии туберкулезной палочки.

Д-ра **Б. Л. Мазура.**

(С рис.).

1.

Еще задолго до открытия возбудителя тbc ботаники<sup>1)</sup> применяли двойную окраску: они окрашивали свои препараты щелочным или спиртовым раствором метиленовой синьки, а затем вторично водным раствором везувина. Им же был известен и тот факт, что иногда при такой двойной окраске некоторые части препарата из растительной паренхимы теряют синюю окраску и окрашиваются в цвет везувина.

Р. Косх, применяя эту двойную окраску по отношению ко всем известным в то время микроорганизмам, убедился, что все они при вторичном окрашивании водным раствором везувина теряют синюю окраску и принимают окраску последнего. Окрашивая же подобным способом различные продукты тbc больных, он убедился, что весь препарат окрашивается в коричневый цвет от везувина, и что на этом коричневом фоне встречается микроорганизм палочковидной формы, который упорно сохраняет свою синюю окраску от метиленовой синьки. Пробуя прививать материал, в котором этот микроорганизм встречался, морским свинкам<sup>1)</sup> и вызывая у них тbc, а с другой стороны получая отрицательный результат при прививке опытным животным продуктов тbc больных, в которых этот микроорганизм отсутствовал, Косх естественно пришел к выводу, пока предположительному, что этот микроорганизм и есть возбудитель тbc.

Эта двойная окраска, давняя Косх'у возможность прийти к столь важному выводу, как известно, послужила ему в дальнейшем доказательством одного пункта его известной триады. Надлежало затем выполнить второй пункт триады—получить чистую культуру этого микроорганизма. Эта задача была самой трудной, ибо микроорганизм этот не развивался на обычных питательных средах, и получить его в чистой культуре Косх'у не удавалось до тех пор, пока он не применил, в качестве питательной среды, свернутой кровяной сыворотки теленка. Но и на этой среде рост получался медленный и скудный.

Насколько получение первой генерации тbc палочки по методу Косх'a трудно, видно, напр., из того, что слишком через 40 лет д-р Цехновицер<sup>2)</sup> писал, что ему ни разу не удалось получить жизнеспособной культуры тbc по методу Косх'a: причину неудачи он усматривал в „неовладении необходимой техникой“.

После знаменитого сообщения Косча, сделанного в 1882 г. во многих местах, однако, все же были получены по его методу чистые культуры возбудителя *tbc*.

Проф. Рох <sup>2)</sup> решил, что данный возбудитель должен расти на агаре. Все его попытки в этом направлении окончились, однако, неудачно. Раздумывая над причиной неудач, Рох сделал предположение, что палочки не развиваются потому, что агар вследствие долгого стояния в термостате, в виду медленного роста возбудителя, слишком высыхает и потому становится негодной питательной средой. Чтобы воспрепятствовать этому высыханию, он решил прибавить к нему какое-либо гигроскопическое вещество и прибавлял глицерин. Неожиданно рост палочек получился при этом быстрый и обильный. С тех пор прибавление глицерина стало *conditio sine qua non* для выращивания *tbc* палочек. Прибавка эта сделала возможным выращивание палочек на различнейших питательных средах: агаре, бульоне, жидкой желатине, картофеле, моркови, репе, брюкве, отваре пивных дрожжей, макаронах, минеральных средах и т. д. Благодаря ей некоторым авторам удалось получить в 50% первую генерацию сразу на агаре.

Deucke <sup>3)</sup> вообще сомневается в возможности выращивания *tbc* бактерий на средах без глицерина и пишет, что „согласно полученным до сих пор результатам следует с осторожностью относиться к сообщениям о росте *tbc* бактерий на питательных средах, лишенных глицерина, ибо не подлежит сомнению, что сильная потребность в глицерине находится в связи с сильным содержанием жира в *tbc* палочках, особенно нейтрального жира, т. е. глицерида жирных кислот“. Вследствие подобного толкования причины необходимости глицерина со стороны столь авторитетного ученого вопрос о выращивании палочек *tbc* на безглицериновых средах есть не только вопрос человеческой настойчивости, но имеет некоторый *raison d'être*. Как известно, причину безуспешного применения данных микробов для целей иммунизации некоторые склонны видеть в их кислотоупорности. Так как, какова-бы ни была причина последней, богатству жиром можно приписывать известную роль в ней, то отсюда естественно желание получить культуру *tbc* с наименьшим содержанием жира, желание выращивать *tbc* палочку на средах с наименьшей возможностью его продукции, т. е. на средах без глицерина. Такие попытки и были сделаны многими, но не всегда удачно. Так, проф. Иновский <sup>4)</sup> на основании работ Armand-Deille'a, Mayer'a, Schöffer'a и Tergoip'e'a отмечает, что глицерин безусловно необходим, хотя его содержание может быть всего 0.8%. Другие получили в этом отношении положительный результат. Так, самому R. Koch'у <sup>5)</sup> удалось получить культуру палочек на нейтральном бульоне без глицерина в виде осадка на дне колбы, при известных условиях опыта (толщина слоя жидкости не более 1 см. и частое взбалтывание среды). Гомогенная культура Feggan'a тоже развивалась на обыкновенном бульоне. В самое последнее время об успешном выращивании *tbc* палочек на обыкновенном бульоне сообщают Любарский и Тогунова <sup>6)</sup>.

Нам удалось также получить культуру *tbc*, которая успешно развивалась на обыкновенном бульоне, в проц сее разработки другого вопроса, сущность которого сводится к следующему:

Как известно, если смешать эмульсию из *tbc* палочек с эмульсией из лейкоцитов, или же впрыснуть такую же эмульсию в кровь, то ми-

кробы быстро захватываются полинуклеарами. Но в них микробы не погибают, а, застрявши на местах оседания лейкоцитов (преимущественно в лимфатических щелях легкого), начинают размножаться, причем полинуклеары гибнут, от них не остается и следа. Отчего, спрашивается, гибнут полинуклеары? Вероятно, вследствие губительного действия на них эндотоксина или токсина туберкулезных палочек. Но о первом здесь не может быть и речи, так как эндотоксины—это субстанции, освобождающиеся только после гибели и распада бактерий, а мы видели, что палочки остаются нетронутыми и способными к дальнейшему размножению. Следовательно, здесь может идти речь лишь о каком-то токсине. Мы задались целью сделать попытку получить культуру tbc, в которой это ядовитое вещество было-бы уничтожено или доведено до минимума.

Так как протоплазматические яды (карболовая к-та, хлороформ) мало влияют на токсины вообще, и последние, наоборот, очень чувствительны к алкоголю („Alkohol ist sehr schädlich“...<sup>3)</sup>), то мы решили попробовать, не удастся-ли вырастить культуру tbc на среде без глицерина, с заменой его этиловым алкоголем, чтобы убедиться, каковы будут свойства этой культуры. Такого рода замена не должна казаться странной, так как в таблице углеродистых соединений, обладающих питательными свойствами (Nägeli), этиловый алкоголь числится, и не на последнем месте, а то, что глицерин, как источник углекислоты, не представляется специфическим веществом для tbc палочек и может быть заменен вообще (глюкозой, сахарозой, лактозой, гликогеном, декстрином).—это установлено твердо.

Мы приготовили 5 колбочек с различным содержанием глицерина и спирта по следующей схеме:

A	47,5 к. с. бульона	+2,0	глицерина	+ 0,75	к.с. этилового спирта		
B	47,0 „ „	+1,5	„	+1,5	„	„	„
C	46,75 „ „	+1,0	„	2,25	„	„	„
D	46,5 „ „	+0,5	„	+3,0	„	„	„
E	47,0 „ „	+ 0	„	+3,0	„	„	„

и делали пересевы, по мере выростания культуры, из одной колбочки в другую, с поверхности на поверхность среды. При этом между D и E нам пришлось вставлять еще промежуточные звенья, а иногда делать пересев на бульон одного и того же состава 2—3 раза. К концу года мы получили рост и на E. Месячная культура имела вид очень тонкой и рыхлой пленки. При пересеве из E на обыкновенной бульон или агар (без глицерина) рост наблюдал и здесь, вначале скудный, с последующими пересевами—более быстрый и обильный. Палочки сохраняли при этом свою кислотоупорность и внешний вид.

## II.

Как известно, tbc бактерии развиваются не только на питательных средах животного и растительного происхождения, но и на минеральных средах. В свое время такие среды были предложены Ушинским, Граенке Рем, Кош'ом, Проскауе'ом и Век'ом и др. При этом, если на питательных средах неминеральных некоторым, как мы видели, удалось получить рост tbc палочек и без добавления к этим средам гли-

церины, то на минеральной среде без глицерина получить рост *tbc* палочек пока, кажется, не удалось никому. В состав этих сред поэтому обязательно должен входить глицерин. Среда Proskauer'a и Besck'a имеет, напр., следующий состав: углекислого аммония 0,35, фосфорнокислого калия 0,15, сернокислой магнезии 0,2, глицерина 1,5, воды 100,0. По составу этой среды видно, что углерод может быть заимствован в ней *tbc* палочкой или из глицерина, или из углекислого аммония.

Мы изменили немного состав этой среды, заменив углекислый аммоний хлористым аммонием и увеличив количества фосфорнокислого калия и глицерина. Среда тогда имеет такой состав: хлористого аммония 0,35, фосфорнокислого калия 0,5, сернокислой магнезии 0,2, глицерина 3,0, воды 190,0.

На этой среде мы часто получали обильные культуры *tbc* палочек. Готовится среда просто: все составные части растворяются при комнатной  $t^{\circ}$ , затем среда разливается по пробиркам и колбочкам и стерилизуется в автоклаве при  $120^{\circ}$  в течение 15—20 минут. Среда при этом остается прозрачной.

Рассматривая состав этой среды, мы видим, что единственным органическим веществом, единственным источником углерода здесь является глицерин. Без глицерина на этой среде роста не получается. Очевидно, тот штамм *tbc* палочек, который мы приучили к росту на обыкновенном бульоне без глицерина, черпает себе углерод для своих построений из органических веществ самого бульона. Тогда возникает вопрос: будет ли этот штамм расти на упомянутой минеральной среде (для краткости обозначим ее буквой „К“), если к ней вместо глицерина будет прибавлен бульон — в качестве источника углеродистых соединений? Оказывается, что да. Мы прибавляли к среде К бульон в количестве 50%, 40%, 30%, 10%, 8%, 6%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3% и т. д. На каждом разведении мы выращивали обыкновенно 5—10 генераций. Наконец мы могли получить рост на среде К и с 0% содержанием бульона. Рост получается при этом как на дне, так и на поверхности среды (в зависимости от способа посева). В первом случае при покатывании пробирки между ладонями видно, как со дна винтообразно всплывает белый осадок в виде песка. Во втором случае мы имели на поверхности среды тоненькую пленочку в виде холестеринавого налета, которая далеко поднимается по стенке пробирки.

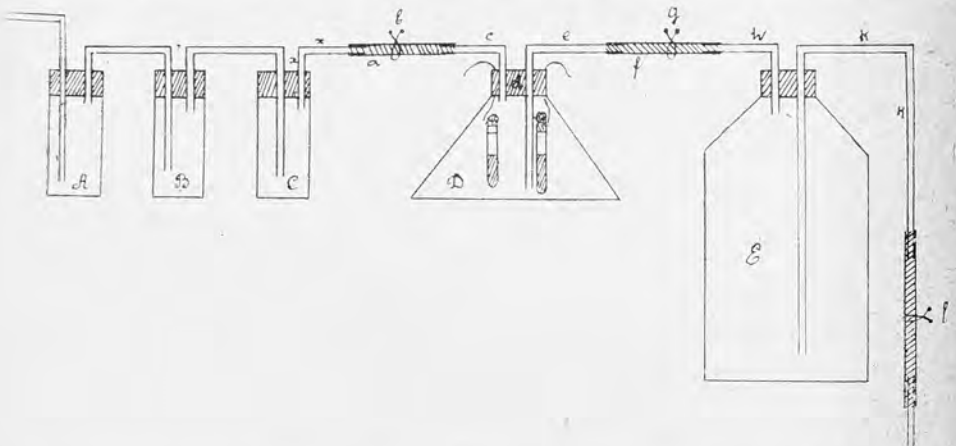
Мы выращивали при тех же условиях и культуру брюшного тифа. Здесь условия лучшие: брюшнотифозная палочка растет и развивается быстро (через сутки) на простом бульоне. Мы применили по отношению к ней тот же метод разведений и количество пересевов, как и относительно *tbc* палочки. Рост получился в виде сплошного помутнения среды. Вначале получалось много инволюционных форм: длинные ветвящиеся нити, палочки, обнаруживающие резкое биполярное расположение протоплазмы при окраске фуксином и т. д. В дальнейшем, по мере привыкания к среде, инволюционные формы почти исчезали. На некоторых разведениях приходилось делать большее число пересевов, так как иногда после 10 генераций культура на более низких разведениях не развивалась. Мы дошли до содержания в среде К 0,25% бульона. К сожалению, штамм этот погиб во время каникул.

Между прочим здесь нужно иметь в виду одну деталь: когда мы доходили до содержания 2%—1% бульона в среде К, последняя через

24—48 часов после посева оставалась как будто стерильной—прозрачной. Но это явление кажущееся, ибо стоило поместить позади пробирки зажженную электрическую лампочку и встряхнуть пробирку, чтобы увидеть, как сплошное помутнение расходуется в виде облачка.

Таким образом из изложенного явствует, что нам удалось получить вполне жизнеспособную тbc культуру (до настоящего времени нами получено 17 генераций), которая развивается на безуглеродистой среде. Теперь возникает вопрос: откуда же тbc палочки черпают углерод для своих построений? Единственный ответ: из углекислоты воздуха. Но для того, чтобы подтвердить справедливость такого заключения, нужно еще доказать, как справедливо заметил нам проф. В. М. Аристовский, что при отсутствии углекислоты воздуха культура развиваться не будет; это послужит и доказательством того, что в применяемых минеральных веществах нет следов органических веществ, достаточных для жизни и размножения тbc палочек. Для доказательства этого ставится следующий опыт:

3 промывные склянки А, В и С (см. рис.), наполовину наполненные 30% раствором едкого калия, соединены при помощи резиновой трубки *a*, снабженной зажимом *b*, со стеклянной трубкой *c*, проходящей через резиновую пробку *a* колбы Д, емкостью в 3 литра. Через ту же пробку проходит стеклянная трубка *e*, которая соединена, при помощи резиновой трубки *f*, снабженной зажимом *g*, со стеклянной трубкой *h*, проходящей через пробку бутылки Е, емкостью в 10 литров. Колба Д наполнена вся водой, бутылку Е—на три четверти. Изогнутая трубка *k*, предварительно наполненная водой и зашпирающаяся зажимом *e*, служит сифоном. При открывании зажима *e* вода медленно вытекает из бутылки Е через трубку *k*, и взамен ее в бутылку присасывается вода из колбы Д, а взамен этой последней в колбу Д протягивается воздух, проходящий предварительно через промывные склянки. Когда вода наполовину вытечет из колбы Д, мы зашпираем зажим *l*,



чем прекращается действие сифона. Тогда мы вынимаем из колбы Д резиновую пробку и опускаем туда 2 пробирки на штатках: одну пробирку со средой *K* с посевом, другую—с прозрачной известковой водой, после чего закрываем пробкой колбу и опять открываем зажим *l*. Вода из колбы Д медленно переходит в бутылку Е. После того, как вся вода из колбы Д вытечет, на место вытекающей воды из бутылки Е туда будет присасываться воздух из колбы Д, который в свою очередь заменится воздухом, проходящим через склянки А, В и С. Пробка *d* колбы Д и отверстия в ней, через которые проходят трубки *c* и *e*, заливаются парафином. После того, как почти вся вода вытечет из бутылки Е, зажимы *b* и *g* закрываются;

резиновые трубки снимаются с трубок *x* и *h*, и колба ставится в термостат. Через стенку ее видно, что известковая вода не мутнеет, и это свидетельствует о том, что в колбе Д воздух не содержит  $\text{CO}_2$ . Контрольная пробирка с посевом ставится в колбу, закрытой резиновой пробкой, рядом в термостат. Каждые 24—36 часов колба Д соединяется с промывными склянками и бутылкой В, наполненной водой, вода вытесняется из бутылки и замещается воздухом, проходящим из колбы Д, которая в свою очередь заполняется воздухом, проходящим через промывные склянки. Таким образом обновляется в колбе Д воздух. Известковая вода в пробирке не мутнеет. В контрольной колбе резиновая пробка каждый раз вынимается на такое же время, тоже для обновления состава воздуха. Через 12—14 дней колба открывается, и тогда можно убедиться, что в то время, как в контрольной пробирке поверхность среды покрыта тонкой пленкой в виде холестеринавого налета, которая поднимается по стенке пробирки, в опытной пробирке на поверхности роста нет (при условии посева на поверхность среды). В известковой воде образуется иногда на поверхности белый тонкий налет, вся же вода прозрачна. При встряхивании на воздухе она мутнеет. Под микроскопом в чашке из пленки мы видим, что имеем дело с чистой культурой кислотолюбивых палочек *tbc*.

Из этого опыта видно, что наша культура *tbc* палочек усваивает углерод из углекислоты воздуха. При этом создается впечатление, что здесь имеет место нарушение основного биологического закона — закона сохранения энергии. Возникает именно вопрос, из какого источника *tbc* палочки получают энергию, необходимую для диссоциации  $\text{CO}_2$ ? Для зеленых растений этим источником служит солнце или, точнее, тепло от поглощенного света, но ведь наша культура развивается в темноте и, следовательно, этот источник отсутствует.

Для того, чтобы ответить на этот вопрос, надо иметь в виду следующее<sup>10)</sup>: органическое вещество характеризуется 2-мя свойствами — наличием углерода и способностью гореть. Но есть вещества минеральные, обладающие способностью гореть, т. е. освобождать свободную теплоту, не содержа при этом углерода: к таким веществам относятся аммиак, сероводород и др. В нашей среде К аммиак как раз и содержится. Вероятно, он-то и служит таким источником энергии.

Таким образом на основании наших опытов мы приходим к выводу, что, при известных условиях, *tbc* палочки могут заимствовать углерод непосредственно из углекислоты воздуха.

## ЛИТЕРАТУРА.

1) и 3) Войтов. Курс медицинской бактериологии, 1894.—2) Целлювицер. Сборник статей по микробиологии, посвященный памяти Шатилова, 1922.—4) и 7) Стернопуло. Дисс. 1908.—5) Деуцке. Практическое руководство по туберкулезу, 1923.—6) Яновский. Туберкулез легких, 1923.—8) Любарский и Гогунова. Тезисы Съезда по туберкулезу 1923.—9) M. Loewit. *Infection und Immunität*, 1921.—10) Палладия. Влияние света на растения («Физиотерапия» Мезерницкого, 1925).

D-r B. L. Masur (Kasan). Zur Biologie der Tuberkelbacille.

Auf dem Grunde einer Reihe von Versuchen kommt D-r M. zu dem Schlusse, dass bei gewissen Bedingungen die Tuberkelbacillen den Kohlenstoff unmittelbar aus der Kohlensäure der Luft erhalten können.