

МИКРОБИОЛОГИЯ

Л. А. ИВАНОВ, член-корреспондент Академии Наук СССР, и **Е. А. ШТЕРН**
К МЕТОДИКЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЫХАНИЯ У МИКРОБОВ

Определение дыхания у микробов требует весьма сложной методики с протягиванием воздуха через ряд сосудов. По схеме, предложенной В.Л. Омелянским, необходимо иметь хорошо работающий аспиратор или водоструйный насос и 9 сосудов для каждой культуры. Кроме того для микроорганизмов, optimum развития которых лежит выше обычной комнатной температуры, необходима термостатная комната или особое термостатное приспособление, так как громоздкость установки не позволяет работать с термостатом обычного типа. Кроме того осложняет работу и подбор сосудов для культивирования микробов. Для нормального развития культур и точного определения выделенной ими углекислоты нужна хорошая аэрация. С целью обеспечить достаточную аэрацию культур Омелянский в опытах с определением дыхания у азотобактера применял даже специальные плоские сосуды (высотой в 3 см).

Учитывая эти трудности, мы разработали иной способ для определения дыхания у микробов. Этот способ доступен по своей простоте каждой микробиологической лаборатории и позволяет вести опыт одновременно в большом числе культур. В основу его положен принцип связывания едким баритом углекислоты, выделяемой микробами в замкнутом объеме.

Берутся две конические колбы с плоским дном: одна меньшая для культур, другая большая для запаса воздуха и введения едкого барита. Она имеет сбоку в верхней части отводную открытую трубку*. Предварительно определяется их емкость. В наших опытах с дыханием азотобактера емкость одной колбы—400 см³, другой—1 100 см³. В верхнюю, меньшую, колбу наливается питательный субстрат с агаром (фиг. 1). После стерилизации и застывания агара производится засев питательной среды водной бактериальной взвесью. Когда взвесь подсохнет**, колба поворачивается вверх дном и вставляется своим горлом в более широкое отверстие нижней колбы. В месте соединения двух колб между стенками их горлышек прокладывается вата, и край замазывается пластилином или специальной замазкой из 2 весовых частей пчелиного воска и 1 части свиного сала. Такая замазка не пропускает воздуха и кроме того она позволяет легко и быстро разъединять колбы. Для изоляции от углекислоты атмосферы к отводной трубке большой колбы (фиг. 1) присоеди-

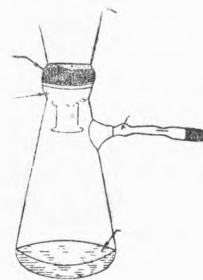
* Для этого пригодны конические колбы, употребляемые для фильтрования под уменьшенным давлением.

** Для ускорения подсыхания можно ставить колбу на 1—2 часа в термостат.

няется небольшая трубка с натронной известью или каучуковая трубка с затвором Бунзена*, которую широко использовал Бухнер в своих известных работах по брожению. Затвор допускает выход воздуха из колбы в случае повышения внутри давления, но не позволяет наружному воздуху входить внутрь при понижении его. Само дыхание в присутствии поглотителя (барита) сопровождается уменьшением объема воздуха в колбе вследствие поглощения кислорода. Увеличение же объема газа в колбах происходит только при перенесении колбы в термостат. Приблизительный подсчет показывает, что выходящий при этом из колбы объем воздуха даже при обогащении его дыханием до 0.5% может содержать не более 0.2—0.3 мг углекислоты. Непосредственный опыт с колбой, перенесенной в термостат при 37.5° на 24 часа и обратно в комнатную температуру, показал уменьшение углекислоты на 0.14 мг.

На дно нижней колбы наливается титрованная баритовая вода, подкрашенная фенолфталеином. Окраска позволяет судить, в какой степени барит нейтрализуется выделяющейся углекислотой, и позволяет во время прекращать опыт, когда еще остается излишек барита.

В опытах с азотобактером мы наливаем 100 см³ баритовой воды с концентрацией 7 г кристаллизованного барита на 1 л дистиллированной воды. Выделяемая микробами углекислота, как более тяжелая, собирается на дне нижней колбы, соединяется с едким баритом и образует осадок углекислого бария. Таким образом расположенные сосуды не позволяют углекислоте скапливаться на поверхности культуры. После определенного времени, например через 3 часа, колбы разъединяются. Колба с баритом плотно закрывается парафинированной корковой пробкой и титруется немедленно или спустя некоторое время. Колба же с культурой микробов быстро переставляется на другую запасную колбу со свежим раствором баритовой воды. Таким образом поглощение углекислоты почти не прерывается.



Фиг. 1.

Одновременно с опытными колбами ставятся аналогичные контрольные, но без культур, с целью определить количество углекислоты, имевшееся в колбах до начала опыта. Это количество в наших опытах колебалось в зависимости от содержания углекислоты в лабораторном воздухе от 0.8 до 1 мг. Титруется баритовая вода обычно соляною или щавелевою кислотой. (2.8636 г чистой перекристаллизованной щавелевой кислоты на 1 л дистиллированной воды. 1 см³ этого раствора щавелевой кислоты соответствует 1 мг углекислоты. При более слабых растворах можно учитывать сотые доли миллиграмма.) По разности титра начального и титра после опыта определяется количество нейтрализованного углекислотой барита, а после введения поправки на контроль и самое количество выделенной при дыхании углекислоты.

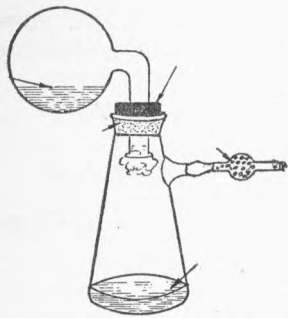
Этот способ дает возможность очень просто определять дыхание микробов за любой отрезок времени на большом числе культур. Результаты опытов по такому методу оказались вполне удовлетворительными. Кривая дыхания у азотобактера, полученная предлагаемым способом, существенно не отличается от кривой Омелянского, пользовавшегося сложной методикой с протягиванием воздуха.

Этот способ дает возможность очень просто определять дыхание микробов за любой отрезок времени на большом числе культур.

Результаты опытов по такому методу оказались вполне удовлетворительными. Кривая дыхания у азотобактера, полученная предлагаемым способом, существенно не отличается от кривой Омелянского, пользовавшегося сложной методикой с протягиванием воздуха.

* Бунзеновский затвор состоит из трубки черного каучука 5 см длиной, со стенками толщиной 0.5 мм. Трубка надевается одним концом на отводную трубку колбы, а другой конец зажимается стеклянной палочкой. В середине трубки, на одной стороне, делается разрез вдоль на 1 см очень острым ножом.

Несмотря на то, что азотобактер принадлежит к числу микробов, наиболее энергично выделяющих углекислоту и вместе с тем чрезвычайно чувствительных к недостаточной аэрации, развитие и пигментообразование культур шло вполне нормально. Очевидно аэрация была вполне достаточной, так как образующаяся углекислота непрерывно падала и поглощалась баритом, а содержание кислорода, как показывает простой расчет, могло уменьшиться не более, чем на $\frac{1}{3}$. Такое уменьшение возможно только в крайнем случае отсутствия смены колб (емкостью 1.5 литра) в течение 3 суток и образования за это время 200 мг (111 см^3) углекислоты. На образование такого количества углекислоты должен быть затрачен (при наиболее вероятном дыхательном коэффициенте, равном 1) такой же объем (111 см^3) кислорода. Так как в 1.5 л воздуха колб первоначально



Фиг. 2.

содержалось 315 см^3 ($1500 \text{ см}^3 \cdot 0.21$) кислорода, то следовательно останется его 204 см^3 , что составляет около 14% и является еще вполне приемлемым для дыхания микробов.

К концу опыта (через 24 дня) микроскопическое исследование культур азотобактера показало, что они остались не загрязненными посторонними микробами, даже если горло не было закрыто ватной пробкой. Впрочем опыт показал, что ватная пробка не препятствует поглощению углекислоты баритом, и результаты опытов с колбами, закрытыми ватными пробками, не отличались от результатов культур без пробок. Только при обжигании пробки необходимо выждать около 6 ча-

сов, прежде чем соединять верхнюю колбу с нижней. В первое время после обжигания вата еще выделяет углекислоту или какие-то органические летучие кислоты, которые понижают титр барита.

Кроме культур в конических колбах возможно применение и культур в пробирках, которые в этом случае пропускаются в пробку, заделываемую в горло нижней колбы. В случае культур в жидких средах верхняя коническая колба должна быть заменена круглой колбой с горлом, изогнутым под прямым углом (фиг. 2). Колено изгиба с отверстием вводится в нижнюю колбу и заделывается так же, как в предыдущем случае, или же предварительно пропускается через пробку. В некоторых случаях для лучшей аэрации полезно сделать плоской ту часть колбы, где помещается жидкость.

Вообще предлагаемый метод достаточно гибок и допускает различные комбинации. Так, кроме выделения углекислоты прибор позволяет одновременно определять и количество поглощенного кислорода. Для этого к отводной трубке может быть прилажен манометр в виде U-образно изогнутой трубки с ртутью. В приборе возможны также опыты и без кислорода с наполнением инертными газами—азотом и водородом.

Ботанико-микробиологическая лаборатория
Государственного рентгенологического,
радиологического и ракового института.
Ленинград.

Поступило
25 III 1939.