

*Из кафедры микробиологии и эпизоотологии
Зав. кафедрой доцент В. Ф. ПЕТРОВ*

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ КОЛОНИЙ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ И БЕЛОГО СТАФИЛОКОККА

АССИСТ. Д. П. ТРОЯНОВСКИЙ

Вопрос о структуре бактериальной колонии тесно связан с вопросами питания и дыхания бактерий, удаления продуктов метаболизма, диссоциации бактерий и др. Колонию мы не можем рассматривать, как беспорядочное скопление бактериальных тел, нагроможденных друг на друга; логически ясно, что должна быть налицо определенная структура, которая обеспечивала бы все жизненные потребности клеток, заключенных в массе себе подобных.

Внутреннее строение колоний изучалось рядом авторов, преследовавших при этом выяснение различных вопросов. Дьяконов (1930 г.) считает, что колония имеет форму гриба и обладает шапочкой и ножкой, внедряющейся в глубь среды. У актиномицет, наиболее полно изученных автором, он отмечает наличие аморфного тела, выше которого располагаются воздушные гифообразные нити, и ниже—мицелиеобразное сплетение, лежащее в толще среды.

Овчинников (1934 г.), проводивший микрофотографическое изучение колоний гонококка, установил, что первые сутки рост колонии происходит равномерно. В течение вторых суток колония немного вырастает в высоту, но главным образом, разрастается по периферии. На третьи сутки рост в высоту прекращается. Рост по периферии становится все слабее и, наконец, тоже прекращается. Центральная часть колонии подвергается перерождению. По периферии же колонии образуются валик из жизнедеятельных микробов, который по мере увеличения центральной зоны отмирающих микробов, постепенно передвигается.

Луговая (1935 г.) считает, что при строении колонии наблюдается отмирание клеток во всей ее массе. Среди этих отмирающих клеток разбросаны жизнедеятельные особи или распределенные диффузно, или собранные в отдельные очаги. В этом случае они соответствуют дочерним колониям.

По периферии колонии также имеется кайма из крупных жизнедеятельных клеток.

Пешков (1936 г.) подтверждает мнение Дьяконова о сходстве колонии с грибом и отмечает наличие в ней веерообразной или фонтанной структуры, а также наличие двух слоев внутреннего и наружного, отличающихся по окраске и морфологии клеток.

Равич Биргер и Свинкина (1944 г.) отрицают закономерность в расположении клеток в колониях желтой сарцины, хотя и считают, что основная форма взаимного соединения клеток—пакетик, при этом частично сохраняется. Авторы изучали феномен образования дочерних колоний и установили, что они состоят из жизнедеятельных клеток,

имеющих резкую окраску и развивающихся на общем фоне распада и лизиса особей, составляющих материнскую колонию. Основание колонии точно также состоит из жизнеспособных, хорошо окрашивающихся клеток.

Изучение структуры колоний проводилось нами путем наблюдения за деятельностью микробов в колонии, помещенной цежиком под иммерсию, и при помощи мазков—отпечатков.

В первом случае мы производили посев свежее полученного кала от телят в 3—4 недельном возрасте, на чашки Петри со средой Дифко, содержащей лактозу. Изучению подвергались колонии кишечной палочки, хорошо развивавшейся на этой среде.

Для изучения колоний мы использовали как среднее увеличение, так и иммерсию. Колонии рассматривались непосредственно на чашках Петри, помещенных на предметный столик микроскопа.

При исследовании под иммерсией на колонию наносилась капля кедрового масла и объектив, осторожно, чтобы не повредить колонию, погружался в жидкую среду.

Через несколько минут после нанесения масла, поверхность колонии покрывалась пузырьками газа, густо усеивавшими ее. Особенно много пузырьков находилось на периферии колонии. Пузырьки имели различную величину. Когда масло под действием тепла, источником которого служили лучи конденсировавшиеся на препарате, теряло свою вязкость, крупные пузырьки отрывались от поверхности колонии, всплывали на поверхность капли масла и здесь лопались. Последнее явление можно было наблюдать под средним увеличением, где линза не погружалась в иммерсионное масло. Это обстоятельство рассеяло все наши сомнения в том, что мы имеем дело, несомненно с пузырьками газа, выделяющегося колонией.

Через пузырьки просматривались светлые пятнышки разной формы и величины. Под крупными пузырьками располагались более крупные устьяца, под мелкими—устьяца малого размера. Эти светлые пространства чаще всего имели неправильную форму, причем устьяца меньших размеров были более округлыми. Окружены они были валом из бактериальных тел, причем вал, ограничивающий более крупные устьяца распадался на несколько фрагментов.

Внутренние очертания устьиц, что было особенно хорошо выражено у более крупных из них, зачастую были зубчатыми, а иногда и ворсинчатыми. После взмучивания масла, устьяца на 15—30 секунд исчезали. Затем очень быстро они появлялись снова, в первую очередь более маленькие, а затем и большие. Первые 3—5 минут они находились в активном движении, меняли свою форму, суживались и расширялись. Затем движение их снова замедлялось.

Фрагменты вала, составляющего крупное устьеце, разъединялись, соединялись снова и из них вновь сформировывалось или вернее пересформировывалось устьеце. Местонахождение устьиц, особенно крупных, было довольно постоянным. Что касается мелких устьиц, то вследствие технических затруднений, обусловленных большим количеством их и общей пестротой картины, изучить насколько стабильно их расположение, не удалось.

При ярком солнечном освещении мы имели возможность просматривать глубокие слои колонии. При этом нами было отмечено, что колония состоит из различной величины аггломератов, заключенных в студенистую массу.

При повторных опытах с кишечной палочкой, пересейанной с одних питательных сред на другие, а также при засеве кала на обычные питательные среды—указанный феномен движения устьиц не наблюдался.

Быть может, при выращивании кишечной палочки на среде Дифко, включающей в себя лактозу, бактериальная колония необходимо должна проявить активность для выделения большого количества газа, образующегося при ферментации этого сахара. Пересевы кишечной палочки в чистой культуре с одной питательной среды на другую точно так же могли изменить её свойства по сравнению с исходным штампом, живущим в микробных ассоциациях кишечника.

Для выяснения природы и назначения вышеуказанных устьиц, нами было предпринято морфологическое изучение структуры бактериальной колонии.

В наших экспериментах мы пользовались в основном двумя культурами—белым стафилококком, выделенным нами из воздуха и кишечной палочкой, полученной из кала взрослого пятимесячного теленка.

Имеющиеся в нашем распоряжении культуры мы засевали на МПА таким образом, чтобы получить изолированные колонии. Из выросших колоний мы готовили мазки—отпечатки. Для этого мы вырезали из чашки Петри кусочки агара с выросшими на них колониями и укрепляли эти кусочки на объективе микроскопа. Движением микрометрического винта туоус опускался и на предметном стекле получался отпечаток колонии. Из одной колонии мы таким образом могли приготовить 20—25 мазков—отпечатков. Вследствие малой величины, такие отпечатки при окрашивании большей частью смывались с предметного стекла. Поэтому мы прибегнули к более крупным мазкам—отпечаткам (5—6 отпечатков на колонию). Такие отпечатки окрашивать было легче. Для фиксации применялся спирт с эфиром апа. Окраска производилась по Граму.

Микроскопия мазков—отпечатков дала следующие результаты:

1. **Стафилококк белый.** Колония состоит из отдельных очагов, то что на обычных мазках называют гроздьями стафилококков. В каждой грозди имеется от 8 до 12 кокков разной величины и разных оттенков окраски. Очаги не прилегают вплотную друг к другу, но разделены межочаговыми пространствами шириной в 1—3 микрона. Отдельные кокки в гроздях соединены между собою прозрачным бесструктурным веществом, которое как футляр облекает гроздь. Это вещество хорошо заметно на неокрашенных препаратах. Возможно, что оно вымывается полностью или частично при окраске мазков.

Масса колонии пронизана ячейками различной величины, иногда общающимися между собой канальцами. В мазках—отпечатках эти ячейки дают впечатление сетки. Мелкие ячейки имеют правильную округлую форму. Формирующие их грозди кокков со стороны, обращенной к просвету, уплощены. Ячейки выстланы нежной бесструктурной пленкой.

В молодых колониях (10—12 часов роста) ячейки отсутствуют. В суточных культурах они заполняют всю толщу колонии. По мере старения колонии, в ее центральной части, начиная с верхушки, отдельные грозди-очаги сливаются между собою в более крупные скопления. Межочаговые пространства исчезают. Отдельные кокки тесно прилегают друг к другу и, наконец, сливаются в бесструктурную массу, окрашивающуюся грам—отрицательно и отливающую стекловидным блеском. В то же время на периферии и в основании колонии, т. е. в том месте, где она непосредственно прилегает к питательной среде, кокки окрашены грам—положительно, имеют резкие очертания и отчет-

ливо отграничены друг от друга. Как на периферии, так и у основания колонии видны хорошо выраженные ячейки различных размеров.

Старение колонии начинается уже после суточного роста. При этом ее центральная часть постепенно превращается в стекловидную, бесструктурную массу, окруженную поясом грам-отрицательных, очень мелких, но отчетливо между собою разграниченных кокков, собранных в грозди. Периферия же колонии состоит из гроздей грам-положительных крупных кокков, превышающих по величине в 3—4 раза грам-отрицательные кокки. От крупных кокков к мелким переход очень резок. Получается впечатление, что в одной колонии имеются как бы две разные культуры.

Поверхность наружного слоя колонии довольно ровная и гладкая. Составляющие ее грозди тесно соединены между собою и обращены наружу уплощенной стороной. Достаточно осторожно снятая верхушка колонии не дает никаких следов ячеистой структуры.

2. КИШЕЧНАЯ ПАЛОЧКА

Строение колонии кишечной палочки до некоторой степени напоминает строение колонии стафилококка, но здесь очаговые скопления палочек имеют не гроздевидную, но угловатую, зачастую вытянутую, несколько напоминающую звездчатую форму.

Соединение палочек в группировки и их очаговая структура отличаются от структуры кокков. Очаги, состоящие в среднем из 10—15 палочек, во многих случаях переходят друг в друга. Иногда бывает трудно сказать, где кончается один очаг и начинается другой. Это особенно относится к ячеистой структуре, где в стенках ячеек обособленность очагов теряется.

Между отдельными очагами, как и у стафилококков, имеются межочаговые щели разной величины, но в общей сложности более крупные, чем у стафилококков.

Как и у стафилококков, молодая колония кишечной палочки сперва не содержит в себе ячеек, но по мере роста ее в ней начинает формироваться кавернозная структура. Ячейки имеют разные размеры. Наиболее малые бывают большей частью округлыми. Просвет крупных ячеек часто имеет овальную форму. Стенки, как тех, так и других — очень гладкие. Выстилающие их клетки располагаются горизонтально или перпендикулярно к периферии просвета, но и в том и в другом случае создают идеально ровную поверхность.

На неокрашенных препаратах, под иммерсией бывает заметна тонкая студенистая пленка, выстилающая изнутри ячейку.

Поверхность колонии покрыта тонким сплошным слоем из бактериальных клеток от 2 до 5 микробных тел толщиной. Там, где к периферии непосредственно примыкают межочаговые пространства или ячейки, они бывают прикрыты слоем микробных тел, хотя бы и в одну клетку.

Колонии кишечной палочки, с которыми мы работали, имели небольшое западение в центре. При старении колонии, что происходило уже после суточного роста ее, в центре крупных очагов отмечалось, в свою очередь, появление одного, а иногда и нескольких очагов, состоящих из плотно соединившихся, начинающих приобретать неясные очертания клеток. В дальнейшем, кратерообразные края колонии отпечатлевались в виде кольцеобразного вала из вязкой мажущейся массы, состоявшей из плотно спрессованных, теряющих свою структуру клеток. За пределами этого вала к периферии колонии располагалась зона, состоя-

щя из обычных очаговых скоплений бактерий, между которыми были рассеяны крупные аггломераты шарообразной формы, составленные из нескольких тесно соединившихся между собою очагов. В этой зоне имелись межочаговые пространства, но ячейки почти отсутствовали. Периферическая же часть колонии состояла из зоны, включающей в себя обычные очаговые скопления и пронизанной ячейками.

Глубокие слои колонии, граничащие с питательной средой, состояли из отчетливо окрашивающихся по Граму клеток, без каких бы то ни было следов разрушения и лизиса. Основание колонии было пронизано ячейками.

Уже в молодых колониях в общей массе палочек, окрашенных по Граму отрицательно, встречаются и грам-положительно окрашенные палочки. С увеличением возраста колонии количество таких палочек возрастает. В колониях, имеющих $1\frac{1}{2}$ — 2 суточный возраст, встречаются участки, в которых количество грам-положительных палочек доходило до 20—25 проц. от общей массы грам-отрицательных палочек, которые в этом случае были бледно окрашены.

Наиболее типичной формой соединения палочек было взаимно перпендикулярное расположение их. Не исключена возможность, что такое взаиморасположение клеток играет роль при сокращении ячеек.

Кроме кишечной палочки и стафилококка, попутно также исследовались дрожжи, диплококки и возбудитель рожи свиней. В колониях этих микробов точно также была отмечена очаговая структура, наличие ячеек и начинающееся с центра отмирание колоний.

ВЫВОДЫ

1. Бактерии, составляющие колонию различаются морфологически (форма, величина, окраска клеток).

2. Колонии бактерий не представляют однородной массы, а имеют сложную структуру.

3. В структуре колоний можно видеть:

а) очаговое развитие клеток; б) ячеистое строение; в) начинающееся с центра отмирание клеток и превращение их в бесструктурную гомогенную массу.

4. При посевах свежее выделенного кала, на питательную среду с лактозой у развившихся при этом колоний кишечной палочки, наблюдается выделение пузырьков газа через находящиеся на их поверхности особые отверстия—устыицы.

5. Можно предполагать, что ячеистая структура колоний обеспечивает процессы, необходимые для существования отдельной бактерии, заключенной в массе себе подобных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дьяконов П. П. Топографическое изучение структуры микроорганизмов Ж. М. Э. И., т. VII, вып. 1, 1930 г.
2. Овчинников Н. М. Микрофотографическое изучение колоний гонококка Ж. М. Э. И., т. XII, вып. 1, 1934 г.
3. Луговая Л. В. Возрастные изменения бактериальных колоний и составляющих их особей Ж. М. Э. И., т. XIV, вып. 5, 1935 г.
4. Пешков М. А. Бактериальная колония, как гистологический объект Ж. М. Э. И., т. XVI, вып. 2, 1936 г.
5. Равич Биргер, Свинкина А. А. К строению бактериальной колонии. Сообщение II. Гистологическое изучение колоний *careina flava* Ж. М. Э. И., № 12, 1944 г.