

ПРОВ 68

ПРОВ. АНУ

ПРОВ 90

ПРОВ 2010

АКАДЕМИЯ НАУК
СОЮЗА СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ТРУДЫ СЕВАСТОПОЛЬСКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ

Том V

TRAVAUX
DE LA STATION BIOLOGIQUE DE SÉBASTOPOL

Tome V

СЕВАСТОПОЛЬСКАЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ СТАНЦИЯ
БИБЛИОТЕКА
№ 9327

10075.

Из книг
В. И. СЕРНОВЫХ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА 1936 ЛЕНИНГРАД

Ю. А. РАВИЧ-ЩЕРБО

О БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПИГМЕНТАЦИИ ЛАНЦЕТНИКА (*AMPHIOXUS LANCEOLATUM*) В КРАСНЫЙ ЦВЕТ, СВЯЗАННОЙ С ЕГО ГИБЕЛЬЮ

Пигментация ланцетников (*Amphioxus lanceolatum*) в красный цвет, часто наблюдаемая исследователями, работающими на Севастопольской биологической станции, — явление настолько обычное, что на него трудно не обратить внимания, тем более, что почти всегда вслед за этой пигментацией наступает постепенная гибель *Amphioxus lanceolatum*.

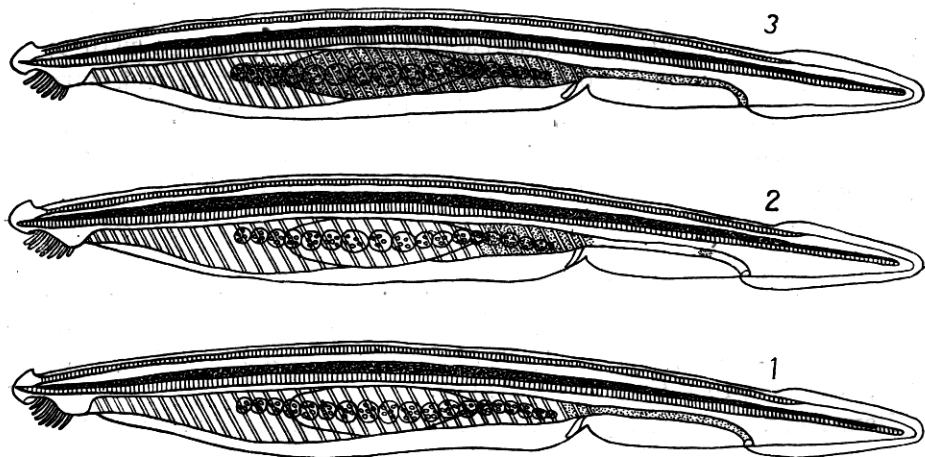
Так как характер этого явления заставлял предполагать бактериальное заражение ланцетников, то б. заведующий Севастопольской биологической станцией В. Н. Никитин обратил мое внимание на это интересное явление, к изучению которого я приступил в лаборатории станции в сентябре 1928 г. По данным, любезно сообщенным мне В. Н. Никитиным, ни ему, ни кому-либо из исследователей, ранее работавшим на Неаполитанской биологической станции, не приходилось наблюдать подобной пигментации ланцетника, обитающего в Средиземном море.

Ланцетники, над которыми производились наблюдения, тотчас же после их доставки на станцию помещались по 10—15 экземпляров в небольшие (15 × 15 × 25 см) аквариумы с проточной водой, на $\frac{1}{3}$ наполненные морским песком. В течение первых же 6—7 дней можно было наблюдать покраснение некоторых из ланцетников, причем пигментированными в пурпурно-красный цвет оказывались гонады или область *porus abdominalis*, реже — характерное красное пятнышко можно было наблюдать вне области кишечника за анальным отверстием (см. фиг. 1, 1 и 2). Вслед за покраснением быстро наступал распад пигментированной части тела ланцетника, и животное погибало на 10—15-й день своего существования в аквариуме. В том случае, если пораженной оказывалась и *chorda dorsalis*, то задняя часть тела ланцетника за точкой поражения оказывалась совершенно парализованной, в то время как передней своей половиной ланцетник еще не лишен был способности зарываться в песок. Пигментированные животные погибали на поверхности песка, при этом в первую очередь разлагались части тела, соседние с пораженным кишечником или гонадами, в последнюю — *chorda dorsalis*.

Подобная картина пигментации ланцетников, их распад и гибель заставляли предполагать, что здесь приходится иметь дело с бактериальным

заражением кишечника амфиоксуса, вызывавшим постепенную гибель животного. Кишечный тракт ланцетника, являющийся благодаря выстилающему его мерцательному эпителию постоянным проводником воды вместе со взвешенным в ней пищевым материалом, в некоторых условиях мог сыграть некоторую роль для развития той или иной микрофлоры.

Микроскопическое исследование содержимого кишечника как непигментированных, так и пигментированных ланцетников не дало возможности решить вопроса о природе красного пигмента. В мазках можно было видеть отдельные бактериальные клетки, сильно преломляющие свет споры и довольно большое количество водорослей, главным образом диатомовых,



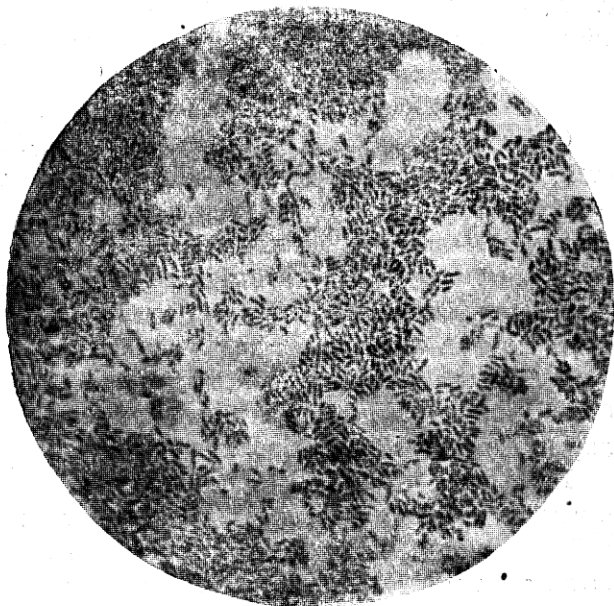
Фиг. 1

клетки которых казались совершенно не измененными. Для более детального знакомства с бактериальной флорой кишечника пигментированных ланцетников делались посевы содержимого кишечника на обыкновенные среды: мясо-пептонный агар и желатину, приготовленные с 3% NaCl, как наиболее подходящие для культуры гнилостных морских бактерий. Для получения посевного материала живой пигментированный ланцетник помещался в стерильную чашку Петри, обмывался 2—3 раза стерильной водой и после этого при помощи шпателя выдавливались из кишечного тракта, через анальное отверстие, частицы пигментированных фекалий, которые и служили для посевов.

Посевы на мясо-пептонные среды, разливки на агар и желатину давали довольно обильный рост самых различных форм, но среди них не оказалось пигментных форм, характер пигмента которых напоминал бы по внешнему виду почти пурпурно-красную окраску зараженных ланцетников. Применение картофельных сред, именно ломтей картофеля, проваренных в течение

3 минут в морской воде и особенно картофельной желатины¹ дало положительный результат. В разливках на картофельную желатину удалось получить рост оригинального вида разжижающих желатину колоний с сильно пигментированным в красный цвет осадком. В чистой культуре это оказалась довольно мелкая (дл. 1 μ , шир. 0.2 μ), факультативно анаэробная подвижная палочка, образующая в молодых культурах короткие цепочки, быстро распадающиеся на отдельные клетки (фиг. 2). Палочка, как оказалось, способна энергично разжижать желатину и энергично выделять на

мясо-пептонных средах H_2S и меркаптан, что указало на принадлежность к формам гнилостным, энергично разлагающим белковые соединения. Характер роста культуры на ломтях картофеля отличался образованием красного, в старых культурах бурокрасного пигмента, весьма схожего с пигментом, наблюдаемым у пигментированных ланцетников. Принадлежность выделенной бактерии к группе гнилостных, с одной стороны, с другой — характер пигмента за-



Фиг. 2

ставили выделить ее из ряда других пигментных бактериальных форм и сделать предположение о возможном ее участии в пигментации ланцетников и их гибели при содержании в аквариумах.

Для проверки сделанного предположения была проведена серия опытов по заражению живых только что привезенных ланцетников культурой палочки.

С этой целью свежие экземпляры ланцетников помещались в обыкновенные пробирки, наполненные до половины морской водой и на одну треть амфиоксусным песком и заражались бактериальной культурой до заметного помутнения воды. Помещенный в (закрытую ватной пробкой) пробирку ланцетник тотчас же зарывался в песок, выставляя над поверхностью

¹ Практическое руководство В. Л. Омелянского, 1923.

лишь передний конец тела с хорошо заметными циррусами. Очевидно, беспрерывным движением мерцательного эпителия ротовой полости через кишечник ланцетника, вместе с током воды, проходило большое количество бактерий, внесенных в воду пробирки. Как показали опыты, в воде, без внесения в нее бактериальной культуры, ланцетники в пробирке способны жить продолжительное время без каких-либо признаков угнетения. В некоторых случаях приходилось наблюдать, что в такой пробирке с ланцетником появлялись водоросли и, повидимому, создавались условия, благодаря которым ланцетник мог существовать в такой искусственной обстановке в течение довольно продолжительного срока. Такие незараженные пробирки обычно служили контролем на ряду с пробирками с внесенными в них бактериальными культурами.

Опыты были поставлены с несколькими культурами, именно, как с чистой, так и нечистой культурой пигментной бактерии, непигментной спорной палочкой, выделенной из смеси с красной бактерией, и оранжевым кокком, выделенным из морской воды.

Кроме того, делались попытки вести опыты на стерильных воде и песке, на воде, профильтрованной через 'свечу Chamberland'a, с целью подойти к стерильным условиям ведения опыта.

Исследования производились с августа 1928 г. по сентябрь 1929 г. с небольшими перерывами в зависимости от наличия на станции свежих экземпляров *Amphioxus lanceolatum*.

Переходя к описанию наиболее демонстративных опытов, остановлюсь в первую очередь на 4 опытах заражения ланцетников смешанной культурой красной пигментной бактерии. Эта смешанная культура была получена на ломтях картофеля, на которых делались посевы пигментированным содержимым кишечника ланцетников. В ней преобладали две формы — красная пигментная бактерия и непигментная спорная крупная палочка, тоже способная разжижать желатину. Культура на картофеле была интенсивно красного цвета. Записи приведены из журнала ежедневных наблюдений за опытами

Опыт I от 3 XI 1929 г. Заражены в одной пробирке два ланцетника, по вышеуказанной методике, из смешанной культуры красной бактерии. На третьи сутки у обоих угнетенное состояние; у большего из них пигментация в красный цвет передней части кишечника. На шестые сутки оба ланцетника пигментированы в красный цвет: у большего сильно окрашены гонады и заметно небольшое красное пятнышко в области апуса. У меньшего пигментация в задней части кишечника. В течение следующих трех суток наступает быстрый гнилостный распад ланцетников с постепенным исчезновением пигментации.

От ланцетников остались только обрывки тканей и остатки спинной струны. Опыт велся при t 22—25°C.

Опыт II от 9 XI. Заражение из той же культуры. Через сутки слабая пигментация в красный цвет задней части кишечника. На 13-е сутки появление пигмента в конечной части хвоста характерного красного цвета. На 19-е сутки появление перетяжки в месте пигментации хвоста. В течение следующих двух суток энергичный распад ланцетников.

Опыт III от 14 XI. Два ланцетника заражены из той же культуры, как и в предыдущих опытах. На 7-е сутки у обоих амфиоксусов кишечник пигментирован в розовый цвет. На 9-е сутки оба погибли, пигмент исчез. На 13-е — в пробирке гнилостный распад тел ланцетников, образование H_2S , почернение песка.

Опыт IV от 3 XI. Взята та же культура. На третьи сутки после заражения слабая пигментация в красный цвет кишечника. На 8-е сутки пигментация хорошо выражена. На 14-е сутки пигмент исчез. Ланцетник жив. Заражение повторено. Вновь появление пигмента розового цвета на третьи сутки.

На 9-е — ланцетник погиб. Началось гнилостное разложение.

В контрольном опыте от 3 XI ланцетник, помещенный в пробирку, не был заражен и прожил без признаков угнетения больше года. В пробирке развелись водоросли.

Следующие опыты были проведены с чистой культурой пигментной палочки.

Опыт V от 16 XI. Заражено два ланцетника. На 3 сутки состояние у обоих угнетенное, у одного из них появление характерного красного пигмента в задней части кишечника. На 6-е сутки оба ланцетника погибают на поверхности песка. В течение следующих нескольких суток наступило типичное гнилостное разложение тел ланцетников с выделением сероводорода.

Опыт VI от 26 III 1930 г. На пятые сутки после заражения вся полость кишечника пигментирована в розовый цвет. Пигмент диффузно проникает в ткани тела. На 16-е сутки ланцетник погиб с началом разложения пигментированных частей тела.

Опыт VII от 26 III. Заражены два экземпляра ланцетников. Через двое суток у одного из них характерная пигментация всего кишечника. Состояние обоих угнетенное. На 8-е сутки в воде трубочки фекалий красного цвета плотной консистенции. Пигмент в кишечнике почти исчез. Ланцетники чувствуют себя нормально, зарываются в песок. Оба жили в продолжение долгого времени.

Опыт VIII от 26 III. Появление характерного пигмента конечной части кишечника на вторые сутки после заражения. Состояние угнетенное, ланцетник слабо зарывается в песок. На 12-е сутки пигмент слабо виден, состояние ланцетника нормальное. Ланцетник остался жив в пробирке в течение продолжительного времени.

Опыт IX от 18 VI. Через сутки после заражения очень угнетенное состояние ланцетников, слабо зарываются в песок. На 3-и сутки в воде окрашенные в красный цвет фекалии. На 8-е сутки пигмент в области кишечника хорошо виден. Ланцетники вялые, движения очень слабы. Наблюдения были прекращены.

Опыт X и XI от 17 VI. На 4-е сутки после заражения ланцетники погибли, имея характерно изогнутые тела, но без появления пигментации в красный цвет.

В контрольном опыте от 26 III ланцетники, не зараженные бактериями, прожили в течение продолжительного времени.

В следующих пяти опытах от 20, 26 XI 1928 г. и 20—22 III 1929 г. ланцетники заражались чистой культурой спороносной палочки, выделенной из смеси с культурой пигментной бактерии, служившей для предыдущих опытов. Ни в одном случае не было отмечено появления характерного красного пигмента, в четырех случаях ланцетники оставались живы продолжительное время, и только в одном оба опытных ланцетника погибли на третьи сутки после заражения.

Одновременно с вышеописанными опытами ланцетники заражались и пигментной желто-оранжевого цвета культурой типа *Micrococcus ruogenes*, выделенной из морской воды, с целью проследить отношение ланцетников к заражению их банальными формами.

Опыт I от 3 XI 1928 г. Ланцетник заражен чистой культурой оранжевожелтого диплококка. Через двое суток появление желтооранжевого пигмента во всем кишечнике (фиг. 1, 3). Ланцетник жив и энергично зарывается в песок. На шестые сутки угнетения не заметно, пигмент несколько слабее, в воде много частичек фекалий, пигментированных в оранжевый цвет. Опыт прекращен, так как пробирка была случайно разбита.

Опыт II, от 14 XI 1928 г. Ланцетник заражен той же культурой, как и в предыдущем опыте. Через сутки кишечник от печени до анального отверстия оказался пигментированным в оранжевый цвет. Ланцетник не угнетен, легко зарывается в песок. На четвертые сутки пигмент исчез. Ланцетник жив, энергичен. Заражение этого же экземпляра было повторено. На третьи сутки, после вторичного заражения, кишечник опять оказался пигментированным в оранжевый цвет. Ланцетник оставался жив. Этот экземпляр был подвергнут фиксации.

Попытки подойти к более стерильным условиям ведения опыта, именно — пользоваться стерильным песком и водой, профильтрованной через свечу Chamberland'a, привели к отрицательному результату, так как как в опыте, так и в контроле ланцетники погибали в течение ближайших же суток, надо думать, как от слишком резкого изменения кислородного режима, так и от недостатка питания.

Суммируя результаты приведенных выше опытов, надо признать, что как нечистые, так и чистые культуры красной палочки действительно вызывают пигментацию *Amphioxus lanceolatum* в красный цвет и служат причиной гибели животных со всеми типичными внешними признаками, обычно наблюдаемыми при содержании ланцетников в аквариумах.

Заражение ланцетников чистой культурой оранжевого диплококка, не принадлежащего к группе гнилостных микробов, не ведет к явлениям, типичным при заражении культурой красной палочки. Механическое заглатывание клеток диплококка и накопление последних в кишечном тракте ланцетника ведет к появлению оранжевого пигмента, исчезающего по мере удаления содержимого кишечника в виде окрашенных в розоватый цвет частиц фекалий.

Эти последние наблюдения позволили еще больше быть уверенным в том, что пигментная палочка действительно патогенна для *Amphioxus lanceolatum*, что, в свою очередь, заставило уделить больше внимания ее морфологической и физиологической характеристике. Способность красной палочки развиваться при температурах как в 20—25° так и при 37° С, поддала мысль испытать культуру на патогенность для теплокровных. С этой целью опыты были поставлены над белыми мышами и проведены при содействии сотрудников Эпидемиологического отделения ГИЭМ А. А. Садова и Б. В. Воскресенского, которым приношу искреннюю благодарность.

Опыты показали, что введение односуточной как бульонной, так и молочной культуры красной палочки мышам *reg os* не оказывают на них никакого действия.

Введение в кровь через хвостовую вену смыва с суточной агаровой культуры (в физиологическом растворе) в количестве 1 см³ действует убивающе. В течение первого получаса наступает весьма угнетенное состояние, и мышь погибает. Мазки из сердца и печени погибшей мыши дали почти чистую культуру красной палочки. При введении меньших доз культуры или при неудачном впрыскивании мыши не погибали, но в местах уколов на хвосте образовывалось сильное нагноение и наступало постепенное омертвление хвоста, начинавшееся обычно с его кончика. Хвост краснел от воспалительного процесса, сплющивался, становился сухим и отмирал, в то время как мышь оставалась жива. Такой результат был получен у всех мышей, которым делались прививки — у всех у них хвосты отмирали на одну и даже более 2 третей.

В некоторых случаях оставался торчать наружу один из хвостовых позвонков.

Таким образом, культура красной палочки оказалась патогенной для белых мышей и способной вызывать энергичные воспалительные процессы.

Как указывалось выше, выделенная форма оказалась довольно мелкой (в среднем $1 \mu \times 0.2 \mu$) неспороносной подвижной палочкой, хорошо красящейся обыкновенными анилиновыми красками и не красящейся по Граму.

На мясо-пептонных средах — появление на 3—4-е сутки роста мелких, прозрачных, с ровным краем колоний. Посевы штрихом на косой агар дают рост культуры в виде прозрачного, с ровными краями, непигментированного налета. Среда постепенно пигментируется в лимонножелтый цвет.

Рост на желатине с довольно быстрым разжижением и с пигментацией хлопьевидного осадка в красный цвет.

На бульоне рост с равномерным помутнением всей среды, без образования пленки на поверхности среды или осадка и с выделением больших количеств H_2S , меркаптана и аммиака. Образование индола не было обнаружено. Бульонные культуры обладают сильным запахом гнилой капусты. На картофеле — рост прозрачного гладкого налета красного цвета, в старых культурах слегка буреющего. На средах с сахаром газа не образует.

Пептонизирует молоко с образованием интенсивного красного пигмента на поверхности среды. На минеральных средах не растет, нитратов не восстанавливает.

По только что приведенным, не совсем полным признакам оказалось трудным выделенную бактерию идентифицировать с ранее описанными формами, образующими красный пигмент.

Просмотр ряда бактериологических определителей (Bergey, Migula, Lehman и Neuman, Matzuschita) указал, что выделенная бактерия по ряду признаков имеет сходство с формами, уже известными. Так, по размерам, характеру разжижения желатины с образованием пигментированного в красный цвет осадка, по росту на твердых мясо-пептонных средах наша бактерия имеет большое сходство с некоторыми видами (*Serratia indica*, *Serr. kielensis*, *Bac. rubidus*) рода *Serratia* (Bergey), но во всех случаях нет полного сходства в деталях, что не позволяет отнести «красную палочку» к тому или другому виду бактерий и требует более детальных морфолого-физиологических исследований.

Вопрос о происхождении данной бактерии и путях заражения ею ланцетников не был разрешен окончательно. Отсутствие «красной палочки» в морской воде было установлено неоднократными разливами. Не удалось ее обнаружить и в песке, в котором живут амфиоксусы, но недостаточное число опытов не дает права утверждать отсутствие ее в нем, тем более что песок оказался очень богат бактериальной флорой, особенно гнилостной, что понятно, так как в состав биоценоза амфиоксусного песка входит много организмов, дающих прекрасный материал для развития гнилостных процессов. Достаточно указать хотя бы на постоянную спутницу *Amphioxus*

lanceolatum рыбку *Ammodites cicerellus* Raf., или червей, в изобилии водящихся в амфиоксусном песке, *Polygordius ponticus* Sal. и *Ophelia laurica* Bobr.

В самом деле, наблюдения над аквариумами, в которые насыпался амфиоксусный песок и содержались ланцетники, указывают на очень быстрое развитие в песке гнилостных процессов в том случае, если он насыпан в аквариум толстым слоем. Большое количество организмов при недостатке аэрации в толстом слое песка погибает и подвергается очень быстрому разложению различными гнилостными бактериями, что ведет к образованию в аквариуме сероводорода и почернению песка от образовавшегося FeS . При содержании ланцетников в этих условиях они очень быстро начинают краснеть, теряют способность зарываться в песок и погибают от гнилостного разложения их тел, как это было описано выше. Чем выше температура, тем скорее наступают в аквариумах гнилостное брожение и гибель ланцетников. Наоборот, при содержании ланцетников при более благоприятных условиях для их существования, т. е. в аквариумах с сильной струей проточной воды, с тонким слоем хорошо аэрируемого песка и при низкой температуре (10—12°C) — амфиоксусы могут жить довольно продолжительное время, до месяца и более, но, в конце концов, все же они оказываются пигментированными в красный цвет и погибают от гнилостного распада тканей их тел.

В виду того, что при разборе свежих порций только что драгированных в море и привезенных на станцию ланцетников не удавалось ни разу найти экземпляры, пигментированные в характерный красный цвет, следует, повидимому, считать описанное явление имеющим место только при содержании ланцетников в аквариумах, в которых условия их существования являются ненормальными. Недостаток аэрации, развитие в песке гнилостных процессов, понижают способность ланцетников противостоять заражению извне, и они подвергаются бактериальному заражению, в первую очередь описанной палочкой, обладающей настолько сильной протеолитической способностью, что пигмент появляется не только в кишечнике ланцетника, но и в других частях тела. Далее в разложении погибающих ланцетников принимают участие и другие гнилостные формы и наступает полный распад их тел.

В заключение считаю своим приятным долгом выразить благодарность, быв. заведующему Севастопольской биологической станцией В. Н. Никитину за неоднократное содействие в проведении работы. Проф. Б. Л. Исаченко приношу искреннюю благодарность за указания в работе и за предоставление возможности ряд наблюдений и опытов по теме провести в Отделе общей микробиологии Государственного института экспериментальной медицины.

J. RAVITCH-STCHERBO

DE L'ORIGINE BACTÉRIENNE DU PIGMENT ROUGE DE *L'AMPHIOXUS LANCEOLATUM*, CAUSE DE SA MORT ET DESTRUCTION

Résumé

Le phénomène de la pigmentation du corps de l'*Amphioxus lanceolatum* de couleur rouge, qui s'explique par la décomposition putride de ses tissus est un fait bien connu et souvent observé à la Station Biologique de l'Académie des Sciences de l'URSS de Sébastopol.

Les intestins des animaux pigmentés soumis à l'analyse bactériologique, nous ont permis de faire la découverte de l'agent de la décomposition. C'est une bactérie menue ($1-0.2 \mu$), mobile, qui a été isolée sur des milieux nutritifs usuels, préparés avec le bouillon de viande peptoné. Sur des milieux à la fécule de pomme de terre elle produit le pigment rouge typique.

Des piqûres, faites à l'*Amphioxus lanceolatum* parfaitement sain avec la culture de cette bactérie, ont montré la virulence de ce microbe, avec la production de la pigmentation rougeâtre du corps de l'animal, qui a succombé avec tous les symptômes caractéristiques.

De l'étude des propriétés de la bactérie découverte, nous avons établi, qu'elle appartient au groupe des putrificateurs, qui décomposent rapidement l'albumine.

Dans les différents essais de l'eau de la mer nous n'avons pu retrouver la bactérie étudiée; le sable fraîchement dragué n'en a pas été contaminé, il ne contenait point les formes de l'*Amphioxus lanceolatum* pigmentées. De ces faits observés nous devons conclure, que la pigmentation de l'*Amphioxus lanceolatum* infecté par la bactérie ne se produit que dans les conditions artificielles de la vie anormale dans les aquariums lorsque leurs forces vitales sont affaiblies, tandis que dans les conditions naturelles, telles que l'eau de la mer, la bactérie pigmentée devient inoffensive en perdant le pouvoir pathogène même en étant localisé dans les intestins de l'*Amphioxus lanceolatum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зернов, С. А. К вопросу об изучении жизни Черного моря, СПб., 1913.
2. Гертвиг, Учебник зоологии, 1912.
3. Du Bois Saint-Sévrin. Parasite des pêcheurs et microbe rouge de la sardine. Annales de l'Institut Pasteur, 1894, p. 152.
4. Mary Hefferan. A comparative and experimental study of bacilli producing red pigment. Centralb. f. Bact., 2-te Abt., Bd. XI, 1904.