

P139350

K.P.



JK

576.8  
Λ-24  
139350



Arbeiten des Milchwirtschaftlichen Instituts zu Wologda SSSR

---

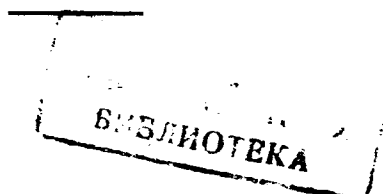
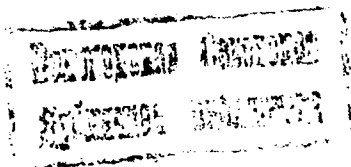
Mitteilungen №№ 76, 77

L. K. Lapinsky

Zur Erforschung der Grenzen der kolloiden Zustandes der Phosphorcalcium-Salze in Gegenwart einiger Elektrolyten und organischer Verbindungen

S. A. Koroljef

Eine neue Methode zur unmittelbaren Zählung der Zellen unter dem Mikroskope im totalen Plane der mikrobiologischen Analyse.



Wologda  
1929

ВОЛОГДСКИЙ МОЛОЧНО-ХОЗЯЙСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ

---

БЮЛЛЕТЕНИ №№ 76, 77

КНИГА

В СОБРАНИИ

Л. К. ЛАПИНСКИЙ

К ИЗУЧЕНИЮ ГРАНИЦ КОЛЛОИДНОГО  
СОСТОЯНИЯ ФОСФОРНО-КАЛЬЦИЕВЫХ СОЛЕЙ  
В ПРИСУТСТВИИ НЕКОТОРЫХ ЭЛЕКТРОЛИТОВ  
И ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Проф. С. А. КОРОЛЕВ

139350  
НОВЫЙ МЕТОД НЕПОСРЕДСТВЕННОГО СЧЕТА  
КЛЕТОК ПОД МИКРОСКОПОМ В ОБЩЕМ ПЛАНЕ  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УЧЕТА

---

Издание Вологодского Мол.-Хоз. Института

ВОЛОГДА  
1929

578.8.  
10-24

Гублит № 1208. (Вологда).

Тираж 1000 экз.

Типография Полиграфтреста «Северный Печатник».

**Бюллетень № 76**

**К ИЗУЧЕНИЮ ГРАНИЦ КОЛЛОИДНОГО СО-  
СТОЯНИЯ ФОСФОРНО-КАЛЬЦИЕВЫХ СОЛЕЙ  
В ПРИСУТСТВИИ НЕКОТОРЫХ ЭЛЕКТРОЛИ-  
ТОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

**Л. К. ЛАПИНСКИЙ**





## К изучению границ коллоидного состояния фосфорно-кальциевых солей в присутствии некоторых электролитов и органических соединений

Фосфорно-кальциевые соли в биологических средах находятся в сложных по составу растворителях.

Растворимость этих солей в воде мала ( $\text{CaHPO}_4$  — при 24,5°—0,020%, а  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  при 30° в 1 л  $\left\{ \begin{array}{l} 0,0036 \text{ г CaO} \\ 0,1316 \text{ г P}_2\text{O}_5 \end{array} \right.$ <sup>1</sup>

Вследствие малой растворимости, на основании закона П. П. Веймарна о скорости конденсации молекул, следует предполагать частое образование фосфорно-кальциевых солей в пересыщенном состоянии. Пересыщенное состояние в биологических средах очень существенно, так как оно обуславливает пластичность вещества.

Сосуществование в растворах фосфорно-кальциевых солей с другими электролитами и органическими соединениями должно как-то отражаться на растворимости этих солей и тем самым перемещать границы коллоидного (пересыщенного) состояния.

Не пытаясь создавать модели какой-либо биологической среды, мы остановились на изучении сосуществования фосфорно-кальциевых солей с некоторыми (по отдельности) электролитами и органическими соединениями.

Настоящая работа, как и родственная ей работа Б. А. Догадкина «Дисперсные свойства некоторых солей плазмы»,<sup>2</sup> намечена при руководящих указаниях проф. С. С. Перова. Методика получения ф.-к. солей была применена та же. Здесь вопрос сведен к более детальному изучению границ коллоидного состояния двух солей и, кроме того, качественно прослежено явление защиты желатиной.

Вопросу о растворимости фосфорно-кальциевых солей посвящены также работы М. К. Домонтович и О. В. Зарубиной.<sup>3</sup>

Целью их работы являлось установить возможность применения правила «постоянства произведения растворимости» к фосфатам кальция.

<sup>1</sup> Landolt—Börnstein. Physikalisch-chemische Tabellen, SS 461—462.

<sup>2</sup> Труды Государственного Тимирязевского Научно-Исследовательского Института.

<sup>3</sup> Научно-агрономический журнал, 1927 г., № 1.

Беря в качестве растворителя воду и растворы электролитов в очень слабых концентрациях (от 0,004 м до 0,01 м), авторы могли установить в некотором приближении пределы колебания «произведения растворимости» фосфатов. При этом авторы устанавливают, что «причины колебаний величины— $lgk$ , превышающие аналитическую погрешность, заключаются, вероятно, в медленности установления равновесия между твердой и жидкой фазами и, может быть, также в образовании комплексных или «адсорбционных» соединений на поверхности твердых частичек трехкальциевого фосфата.

Предположение об образовании на поверхности трехкальциевого фосфата каких-то адсорбционных соединений исключается в значительной мере следующим выводом авторов из той же работы: «изменения общей концентрации электролитов (в указанных пределах), изменения относительной величины осадка фосфата кальция, а также и изоляция этого осадка от главной массы раствора посредством коллоидной перепонки—не оказали определенного влияния на величину— $lgk$ ».

Подход, осуществленный в работе Б. А. Догадкина,<sup>1</sup> дает материал к объяснению перемещения границ растворимости фосфатов кальция ролью только поддерживательного напора электролитов с большей растворимостью.

В нашей работе этот подход проведен дальше. Наблюдения над изменениями растворимости носили главным образом полуколичественный характер. Коллоидное состояние отмечалось по феномену Тиндаля и в ультраконденсоре.

Вода, употреблявшаяся в работе, была освобождена от углекислоты, реактивы—высшей чистоты, посуда—иенская, тщательно пропаренная.

Ди- и трикальций-фосфаты исследовались в таких концентрациях, при которых они в водном растворе осаждались через довольно большие промежутки времени (30—40 мин.), иными словами—в концентрациях, близких к полной растворимости, при которых образуются довольно устойчивые суспензоиды.

В качестве способа определения влияния того или иного растворителя служил переход суспензоида в более устойчивое состояние, при котором он не выпадал в осадок в течение нескольких или многих часов.

При каждом опыте велось контрольное наблюдение.

Кроме электролитов, для исследования был взят молочный сахар, который вносился в растворах различных концентраций перед и после сливания. Внесенный перед сливанием, он создал в системе поддерживательный напор, при котором изменились условия равновесия фосфорно-кальциевой соли в растворе.

Также не менее любопытно было проследить защиту ф.-к. соли белковым золем.

<sup>1</sup> Научно-агрономический журнал, 1927 г., № 1.

Желатина в слабых концентрациях вносилась перед сливанием в половинных количествах к обоим сливаемым растворам — к раствору  $\text{CaCl}_2$  и соответственно к растворам  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . Последний метод применялся Дж. Александром.<sup>1</sup>

Таким образом, сосуществование фосфорно-кальциевых солей прослежено начиная от электролитов и кончая коллоидными системами.

В дальнейшем изложении мы будем придерживаться такого порядка: сначала проследим весь опытный материал, относящийся к  $\text{CaHPO}_4$ , и затем — к  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

Сливание  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  в различных концентрациях дало следующие состояния дисперсности, отмеченные в таблице I.

Раствор  $\text{CaHPO}_4$  в концентрации N/2000 был оставлен на продолжительное время, в течение которого он исследовался с помощью ультраконденсора, и пропускался пучок света для наблюдения явления конуса Тиндаля. Приблизительно через 15 дней гетерогенность системы не наблюдалась. Не удалось также заметить каких-либо осадков на дне или стенках пробирки (пробирки, в которые брались пробы, тотчас же закрывались каучуковыми пробками). Так как из дистиллированной воды углекислота была удалена, то остается приписать исчезновение фазы гидролизу.

Так как промежуток между концентрациями N/300 и N/2000 (см. табл. I) велик, нами была дополнительно получена концентрация N/1000 ведущая себя очень сходно с поведением концентрации N/2000.

Концентрация N/300 была взята для дальнейших изучений по сосуществованию  $\text{CaHPO}_4$  с электролитами.

Были взяты следующие электролиты плазмы —  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCl}$  и  $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ .

Таблица II показывает поведение  $\text{CaHPO}_4$  при сосуществовании с различными концентрациями  $\text{NaCl}$ , прибавленного к  $\text{CaCl}_2$  перед сливанием.

Прозрачный раствор, не изменяющийся в течение 12 часов, образуется при концентрациях  $\text{NaCl}$  около N/11 или 0,53%.

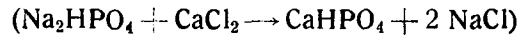
Через 10 часов после сливания в контрольную колбочку при легком взбалтывании было прилито 10 см<sup>3</sup>  $\text{NaCl}$ ; N-изменений (видимых) не произошло. Еще через час был всыпан 1 г сухого  $\text{NaCl}$ , — через сутки никаких видимых изменений не наблюдалось. При наблюдениях, последовательно, еще через 7 и 9 дней изменений отметить не удалось.

Проследим влияние  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

В отличие от  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  был предварительно в одном опыте прилит к  $\text{CaCl}_2$ , в другом — к  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , результаты приведены в таблицах III и IV.

<sup>1</sup> Джером Александр. Коллоидная химия, стр. 47.

Таблица 1



Концентр. сливаемых растворов.	Концентр. по отношению к $\text{CaHPO}_4$	Характеристика системы по получении и в последующие моменты наблюдения.					
		В момент получения					
N/60	N/120	Мутный раствор	Через 3 мин.—осадок				
N/65	N/130	Мутный раствор	Через 3 мин.—начинает выпадать тонкий осадок				
N/80	N/160	Опалесцирующий раствор	Через 1 час 50 мин.—осадок				
N/120	N/240	»	Через 1 час 50 мин.—неполное выпадение осадка				
N/150	N/300	Слабый конус Тиндаля	Через 1 час 50 мин.—неполное выпадение осадка				
N/1000	N/2000	На вид совершенно прозрачный раствор. Конус Тиндаля очень слабый. В ультраконденсоре заметны блестяки	Через 1 час 50 мин.—без изменения	Через 5 дней—видимых изменений нет. Слабый конус Т.	Еще через 1 день Тоже	Через 15 дней от начала опыта конус неразличим. Видимых на глаз изменений нет	Через 22 дня Тоже

Таблица II

К раствору  $\text{CaCl}_2$  (N/150) перед сливанием прибавлялся NaCl в N концентрации

Концентрация золя $\text{CaHPO}_4$	К $\text{CaCl}_2$ прилито раствора NaCl <i>см<sup>3</sup></i>	Х а р а к т е р и с т и к а с и с т е м ы				
		NaCl содержится в растворе (золе)		Конус Тиндаля	Наблюдение в ультра-конденсоре	Через 12 часов
		В N	В %			
N/300	1	N/41	0,14	Хорошо выражен.	Амикроскоп. конус	Порошкообразный осадок
N/300	2	N/21	0,28	Слабо выражен.	Тоже очень слабо выражен	Очень слабо выражен конус Тиндаля
N/300	4	N/11	0,53	Нет	Нет	Прозрачный раствор
N/300	8	N,6	0,98	Нет	Нет	» »
N/300	16	N/3,5	1,67	Нет	Нет	» »
N/300	Контрольн.			Через 30 мин. (приблизительно) осадок		

Таблица III

Получение  $\text{CaHPO}_4$  в присутствии  $\text{N/4 Na}_2\text{SO}_4$  с предварительным прибавлением  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  к  $\text{CaCl}_2$

$\text{CaHPO}_4$	$\text{Na}_2\text{SO}_4$ N/4 приливается к $\text{CaCl}_2$ перед сливанием в количестве $\text{cm}^3$	Концентрация $\text{Na}_2\text{SO}_4$		Конус Тиндаля	Через сутки
		в N	в %		
N/300	0,5	N/324	0,044	Ясно выраж.	Осадок
N/300	0,6	N/271	0,053	Слабо выражен.	Не исследов.
N/300	0,7	N/233	0,061	»	»
N/300	0,8	N/204	0,070	»	»
N/300	0,9	N/182	0,078	Очень слабо	»
N/300	1,0	N/164	0,087	Нет	Прозрач. раствор
N/300	4,0	N/44	0,323	»	Не исследов.
N/300	10,0	N/20	0,710	»	»
N/300	Контрольн.	Через (приблиз.) 30 мин. осадок.			

Прозрачный раствор получился при концентрации  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  N/164 или 0,087%.

С повышением концентрации  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  раствор остается прозрачным.

Таблица IV

Получение  $\text{CaHPO}_4$  в присутствии (N/4)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  с предварительным прибавлением  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  к  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

$\text{CaHPO}_4$	N/4 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ приливается к $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ перед сливанием в количестве $\text{cm}^3$	Концентрация $\text{Na}_2\text{SO}_4$		Конус Тиндаля	Через 12 час.	
		в N	в %			
N/300	0,2	N/810	0,018	Ясно выражен конус	Осадок	В течение последующих 16 дней осадок оставался неизменным.
N/300	0,5	N/324	0,044	Слабо выражен конус	Конуса нет	
N/300	0,7	N/233	0,061	Нет	Тоже	
N/300	1,0	N/164	0,087	Нет	»	
N/300	4,0	N/44	0,323	Нет	»	
N/300	Контрольная	Через 35 мин.—осадок.				

Прозрачный раствор получился при концентрации  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  N/233 или 0,061%.

С повышением концентрации  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , как и в предшествовавшем опыте, раствор остается прозрачным.

Для более полного сравнения влияние присутствия  $\text{KCl}$  при образовании  $\text{CaHPO}_4$  и после образования было проведено два параллельных опыта, приведенных в таблицах V и VI.

Таблица V  
Получение  $\text{CaHPO}_4$  в присутствии  $\text{KCl}$ , прилитого к  $\text{CaCl}_2$

$\text{CaHPO}_4$	$\text{KCl}$ N/10		Концентрация $\text{KCl}$		Конус Тиндалля	Через 2 часа	Через 10 часов	Еще через 10 часов
	В с.л <sup>3</sup>	В N	В	%				
N/300	1	N/410	0,018		Ясно выражен.	Видимых изменений нет	Осадок и взвесь круп- ных хлопьев	
N/300	2	N/210	0,036		Слабо выражен.	»	Тоже	Осадок
N/300	3	N 143	0,052		Нет	»	Начало дифференци- ции осадка.	»
N/300	4	N/110	0,068		Нет	»	Мутный раствор	»
N/300	5	N/90	0,083		Нет	»	Конус Т.	»
N/300	Контрольная—через 30 мин. осадок					»	Слабо выражен. конус Т.	»

В первые часы после образования  $\text{CaHPO}_4$  в присутствии  $\text{KCl}$  в концентрации N/143 получается прозрачный раствор. С повышением концентрации  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaHPO}_4$  более устойчиво сохраняется в растворенном состоянии. В приведенном опыте мы не дошли до концентрации  $\text{KCl}$ , при которых устойчивость  $\text{CaHPO}_4$  была бы полной, но тенденция к этому была совершенно определенная.

Таблица VI  
Приливание сразу после сливания N/10  $\text{KCl}$

$\text{CaHPO}_4$	N/10 $\text{KCl}$	Концентрация		Конус Тиндалля	Через 2 часа	Через 10 часов
	В $\text{cm}^3$	В N	В %			
N/300	1	N/410	0,018	Во всех колбочках конус	Т о ж е	Во всех хлопьевид- ный осадок
N/300	2	N/210	0,036			
N/300	3	N/143	0,052			
N/300	4	N/110	0,068			
N/300	5	N/90	0,083			
N/300	Контрольная—осадок через 30 мин.					

$\text{KCl}$ , прилитый сразу после образования  $\text{CaHPO}_4$  (в течение 1—2'), не создал того поддерживательного напора, который наблюдался в предшествовавшем опыте.

Чтобы резче отметить отсутствие поддерживательного напора при прилитии электролитов после образования  $\text{CaHPO}_4$ , осадки были оставлены на укрупнение частиц в течение 10 часов. Затем был прилит  $\text{KCl}$  в резко повышающихся концентрациях и дополнительно внесена сухая соль  $\text{KCl}$ .

Как показывают результаты опыта, приведенные в таблице VII, никакой пептизации осадков не произошло. Явление пептизации, в отличие от поддерживательного напора, определяется свойством электролита переводить вещество, на которое он действует, в более высокодисперсное состояние.

Очень сильные пептизирующие и поддерживающие свойства обнаружил лимоннокислый натрий.

Вместе с тем, прилитый сразу после образования  $\text{CaHPO}_4$ , он поддерживал слабее, чем будучи прилит перед образованием.

В таблице VIII и IX приведены материалы двух параллельных опытов с лимоннокислым натрием, иллюстрирующие приведенные заключения.



Таблица VII

Пептизирование осадка СаНРО<sub>4</sub> N/300 с помощью КСI после 10-часового стояния

СаНРО <sub>4</sub>	Через 10 часов прилило КСI	Концентрация КСI		Наблюдения через 12 часов				
	с.м <sup>3</sup>	В N	В %					
N/300	1 N/10	N/410	0,018	Осадок	Дальнейших наблюдений не велось			
N/300	1 N	N/41	0,182	Тоже	Т о ж е			
N/300	10 N	N/5	1,492	Тоже	Прибавл. 0,5 г сухого КСI	Через 6 часов никаких изменен. не произошло	Вновь прибавл. 1,0 г сухого КСI	Через 4 часа никаких изменен. не произошло
N/300	Контрольная—осадок (приблизительно) через 30 мин.							

Таблица VIII  
Пептизация  $\text{CaHPO}_4$  с помощью  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ . Перед сливанием прибавляется к  $\text{CaCl}_2$

$\text{CaHPO}_4$	N/10 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ приливался перед слива- нием к $\text{CaCl}_2$	Концентрация $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		Конус Тиндаля	Через 3 часа
	В $\text{см}^3$	В N	В %		
N/300	0,1	N 4010	0,00289	Ярко выражен.	Ярко выражен. конус
N/300	0,2	N/2010	0,00577	»	»
N/300	0,3	N/1343	0,00860	Слабо выражен.	Слабо выражен.
N/300	0,4	N/1010	0,01149	Нет	Нет
N/300	0,5	N 810	0,01433	Нет	Нет

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  перестает поддерживать  $\text{CaHPO}_4$  в растворе при концентрации около N/1343.

Таблица IX  
N/10  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  был прибавлен после сливания

$\text{CaHPO}_4$	N/10 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	Концентрация $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		Конус Тиндаля	Через 2 часа
	В $\text{см}^3$	В N	В %		
N/300	0,1	N 4010	0,00289	Во всех стаканчиках ясно выражен конус	Т о ж е
N/300	0,2	N/2010	0,00577		
N/300	0,3	N/1343	0,00860		
N/300	0,4	N/1010	0,01149		
N/300	0,5	N 810	0,01433		
N/300	Контрольная—осадок (приблизительно) через 30 мин.				

Пептизация прошла в более высоких концентрациях  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  при продолжительном воздействии. В следующей таблице X приводится материал продолженного опыта.

Таблица X.

N/10  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  был прибавлен после сливания (продолжение опыта, приведенного в таблице IX)

СаНРО <sub>4</sub>	Количество N/10 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ в см <sup>3</sup>	Концентрация N/10 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		Конус Тиндаля	Через 2 часа	Через 10 часов
		В N	В %			
N/300	1	N/410	0,0283	Хорошо выражен.	Тоже во всех	Конуса нет
N, 300	1.5	N/277	0,0420	Слабо выражен.		»
N. 300	2,0	N,210	0,0552	Нет		»
N/300	2,5	N/170	0,0683	Нет		»
N/300	3,0	N/143	0,0810	Нет		»
N/300	Контрольная—осадок (приблизительно) через 30 мин.					

Полная пептизация сразу же по прилитии произошла при концентрации  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  N/210 или 0,0552%.

Выяснивши условия равновесия между выбранными нами электролитами плазмы с СаНРО<sub>4</sub>, мы поставили задачу проследить защиту белковым веществом. В качестве белкового вещества была взята белая желатина высшего качества (немецкой фирмы). Перед приготовлением растворов желатина вымачивалась не менее часа в дистиллированной воде.

Слабые растворы желатины 0,0005% не защитили СаНРО<sub>4</sub> от выпадения (табл. XI).

Чтобы создать более благоприятные условия для защиты, была повышена концентрация желатины, и все растворы (желатины и солей) перед сливанием подогревались до 40° С в подражание биологическим условиям (табл. XII).

При концентрации желатины в 0,015% наступила ясно выраженная защита. Были взяты две пробы, одна с концентрацией желатины в 0,015%, другая—0,13%. В течение первых дней никаких видимых изменений не было заметно. Через 4 дня появились изменения, в первой пробирке выпал осадок (рыхлый), во второй образовалась тонкая суспензия. Защита желатиной замедлила процесс агрегации, не исключив ее совершенно, как это наблюдалось в присутствии электролитов. Как видно из таблицы XII, при двух концентрациях желатины в растворе 0,015 и 0,13 наступали некоторые изменения в системах.

Рис. 2

Таблица XI

Защита  $\text{CaHPO}_4$  от выпадения с помощью желатины

$\text{CaHPO}_4$	Общее количество раствора желатины (1 : 10000)	Концентрация желатины	Конус Тиндаля	Через 2 часа	
	В $\text{см}^3$	В %			
N/120	2	0,0005	Мутный раствор	Осадок хлопьевидный	
N/160	2	0,0005	Т о ж е	Т о ж е	
N/240	2	0,0005	Хорошо выражен конус	Тоже. Осадок едва заметен	
N/300	2	0,0005	Т о ж е	Хорошо выражен конус. На вид совершенно прозрачный раствор	Через 12 часов студнеобразный осадок
N/300	Контрольная		Хорошо выражен конус	Осадок (приблизительно) через 30 мин.	

Таблица XII

Опыт с внесением различных концентраций желатины перед сливанием

Желатина вносилась в равных количествах в оба сливаемые раствора  
Растворы желатины и солей подогревались перед сливанием до 40° С

СаНРО <sub>4</sub>	Общее колич. 1% желатины	Концентрация желатины					
	В см <sup>3</sup>	В %					
N/300	0,4	0,010	Через 10 м. стала появляться ясная опалесцен.	Через 30 м. начал выпадать хлопьевид осад.	Наблюдения не продолжены		
N/300	0,6	0,015	»	Ясная опалесценация	Через 10 ч. видимых измен. незаметно	Через 4 дня рыхлый осадок. (Консервиров. не было)	Еще через 7 дн. осадок при встрях. давал суспензию.
N/300	1,0	0,024	»	»	Наблюдения не продолжены		
N/300	2,0	0,050	»	»	Наблюдения не продолжены		
N/300	6,0	0,130	Ясно выражен. опалесценция через 1 ч. 30 м.	»	Через 10 ч. видим. изменений нет	Через 4 дня тонкая суспензия	Еще через 7 д. осевшая очень тонкая суспензия
N/300	10,0	0,200	Опалесценции нет. Конус выражен хорошо	Наблюдения не продолжены			
N/300	Контрольн.	Через 30 мин. приблизительно осадок					

Интересно было проверить влияние желатины после образования  $\text{CaHPO}_4$ . Желатина, в возрастающих концентрациях, была прилита в одном случае через 5 мин. после сливания, в другом—через 30 мин., как только начал образовываться осадок.

Таблица XIII

Опыт по приливаю желатины к  $\text{CaHPO}_4$  после сливания

$\text{CaHPO}_4$	Общее количество желатины 1%	Содержание желатины	Через 12 часов после сливания
	В <i>см</i> <sup>3</sup>	В %	
Раствор желатины прилит через 5 минут.			
N/300	0,2	0,005	Осадок
N/300	2,0	0,050	Мутный (молочный) раствор
N/300	10,0	0,200	Легкая опалесценция
Раствор желатины прилит через 30 минут			
N/300	0,2	0,005	Осадок
N/300	2,0	0,050	Мутный (молочный) раствор
N/300	10,0	0,200	Легкая опалесценция

После прилития раствора желатины производилось полное перемешивание. После 12-часового стояния получилась картина, на вид совершенно сходная с первоначальной. К сожалению, не удалось проследить дальнейших изменений. Несомненно, как указывают предшествовавшие опыты, произошли бы постепенная агрегация частичек и выпадение осадков.

В данном случае важно отметить, что при небольшом укрупнении частичек их легко взвесить защитным коллоидом.

Очень интересные результаты дал молочный сахар. Он оказался способным создавать поддерживающие условия для фосфорно-кальциевых солей.

Молочный сахар в больших концентрациях, около 2%, прилитый до сливания, оказался способным хорошо поддерживать в растворе  $\text{CaHPO}_4$ .

Прилитый после сливания через 10—15', до образования осадка, он не создал достаточного поддерживательного напора в системе (табл. XIV).

Следует отметить, что после некоторого стояния  $\text{CaHPO}_4$  с раствором 1,89% молочного сахара наблюдается явление конуса Тиндаля. Можно предполагать некоторую агрегацию частиц. Так как, по времени, наблюдения были сравнительно непродолжительны, трудно сказать, при какой дисперсности  $\text{CaHPO}_4$  могло установиться постоянное равновесие.

Таблица XIV

Опыт по изучению влияния мол. сахара, прибавленного к СаНРО<sub>4</sub> перед сливанием поровну к каждому из сливаемых растворов и после их сливания

СаНРО <sub>4</sub>	Общее колич. молоч. сахара в концентрации N/4	Концентрация молочного сахара		Характеристика системы. Через 8 часов после сливания		
	В см <sup>3</sup>	В N	В %			
Перед сливанием						
N/300	0,2	N/804	0,047	Осадок		
N/300	2,0	N/84	0,45	Осадок		
N/300	10,0	N/20	1,891	Нет даже помутнения. (Явление Тиндала не было наблюдено)	Через 2 дня заметен хороший конус	Еще через 7 дней без изменения. Заметен хороший конус
После сливания через 10 — 15 минут						
N/300	0,2	N/804	0,047	Осадок		
N/300	2,0	N/84	0,45	Осадок		
N/300	10,0	N/20	0,891	Осадок		
N/300	Контрольная — осадок (приблизительно) через 30 минут					

Переходя к рассмотрению сосуществования  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  с теми же соединениями, отметим, что вследствие изучения влияния электролитов  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и  $\text{NaCl}$  в работе Б. А. Догадкина, <sup>1</sup> порядок проработки опытного материала нами изменен. В конце изложения приводятся материалы опытов с  $\text{NaCl}$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , близко совпавшие с данными Б. А. Догадкина.

Исследования производились с  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  в концентрации N/600. В контрольных опытах выпадение осадка происходило приблизительно через 40—50 минут.

Таблица XV  
Получение  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  сливанием  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_3\text{PO}_4$

Концентрации сливаемых солей	Концентрации $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Характеристика системы	Через час	Через 7 часов	Через 11 часов	Через 7 дней
N/325	N/650	Мутный хорошо опалесцирующий раствор	Осадок	Осадок	Осадок	Осадок
N/400	N/800	Слабо опалесцирующий раствор	Ярко-выражен. конус	Осадок	Осадок	
N/600	N/1200	Опалесценции нет	Конус выражен хорошо	Слабо-выражен. конус	Через 11 час. конус неразличим	Через 7 дней без перемен

Наиболее сильный пептизатор  $\text{CaHPO}_4$  также очень сильно поддерживал в растворе и  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

Таблица XVI  
Пептизация  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  с помощью  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Приливо $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ N	Концентрация $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		Через 30 минут	Через 1 час
	В $\text{cm}^3$	В N	В %		
N/650	0,2	N/201,0	0,0577	Осадок	Конус Т.
N/650	1,0	N/41 0	0 283	Конус Т.	Нет
N/650	2,5	N/17,0	0,683	Тоже	Нет
N/650	Контрольн.	Через 50 мин. осадок			
N/800	0,2	N/201,0	0,0577	Конуса нет	Нет
N/800	1,0	N/41,0	0,283	» »	»
N/800	2,5	N/17,0	0,683	» »	»

<sup>1</sup> Труды Тимирязевского Н.-И. Ин-та, 1925 г.



Полное поддерживание намечается с концентрации N/41,0 или 0,283%. При концентрации N/201,0 или 0,0577% произошел своеобразный процесс. В начале в присутствии  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  образовался осадок, в последующие 30 мин. совершенно пептизировавшийся. Это заставило в последующем поставить несколько опытов, указавших на более низкие концентрации способные пептизировать  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  до и после сливания.

Таблица XVII

Опыт по предварительному и последующему (после сливания) приливанию N  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  к  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	N $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ приливо перед слива- нием	N $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ приливо после сли- вания	Концентрация $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		Через 5 минут	Через час
	В $\text{см}^3$	В $\text{см}^3$	В N	В $\text{см}^3$		
N/600	0,1	—	N/401	0,0289	Конуса Тиндаля нет	Конуса Тиндаля нет
N/600	0,5	—	N/81	0,1433	»	»
N/600	1,0	—	N/41,0	0,2830	»	»
N/600	5,0	—	N/9	1,2893	»	»
N/600	—	0 1	N/401	0,0289	Конус Тиндаля	»
N/600	—	0,5	N/81	0,1433	Конуса Тиндаля нет	Конуса Тиндаля нет
N/600	—	1,0	N/41,0	0,283	»	»
N/600	—	5,0	N/9	1,2893	»	»
N/600	Контроль- ная				Конус Тиндаля	Суспен- зия

Приливание  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  после сливания несколько не изменило его способность поддерживать  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  в растворенном состоянии. Та же картина получилась и при малых концентрациях  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , при которых, правда, явление поддерживания было недостаточно резко выражено.

Таблица XVIII

Опыт по предварительному и последующему (после сливания) приливанию N/100  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  к  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	N/100 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ прилито перед сли- ванием	N/100 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ прилито после сли- вания	Концентрация $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		Через 5 минут	Через 1 час 30 мин.	Через сутки	
	В $\text{см}^3$	В $\text{см}^3$	В N	В %				
N/600	0,2	—	N/20100	0,000577	Конус Тиндаля	Грубая суспензия	Осадок	
N/600	2,0	—	N/2100	0,005526	» »	Тонкая суспензия	Осадок	
N/600	5,0	—	N/900	0,012890	» »	Конус	Конуса нет	
N/600	—	0,2	N/20100	0,000577	» »	Грубая суспензия	Осадок	При прибавлении (следующих) 5 $\text{см}^3$ получилась частич- ная пептизация
N/600	—	2,0	N/2100	0,005526	» »	»	»	
N/600	—	5,0	N/900	0,012890	» »	Суспензия	»	
N/600	Контроль- ная				Конус	Осадок	»	

Желатина, внесенная без подогревания и с подогреванием растворов до 40° С, дала одинаковую защиту. Защита (временная, как и с СаНРО<sub>4</sub>) происходит при концентрации около 0,050. Очень сходно с концентрацией, защищающей СаНРО<sub>4</sub>. N/300.

Таблица XIX

Опыт внесения защитного коллоида — желатины (внесено по способу двойной защиты без подогревания).

Са <sub>3</sub> (РО <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Общее колич. 1 % желатины В см <sup>3</sup>	Концентрация желатины В %	Через 5 минут по сливанию	Через 1 ч. 30 м.	Еще через 1 час	Еще через 10 часов	Через 5 дней
N/600	0,2	0,005	Конус Т.	Конус Т.	Конус Т.	Конус Т.	Суспензия
N/600	2,0	0,050	»	»	»	»	»
N/600	10,0	0,200	»	»	»	»	»
N/600	Контрольн.	—	»	Суспензия	Осадок	Осадок	—

Таблица XX

Опыт с внесением защиты в виде желатины (1%) по способу двойной защиты при предварительном подогревании до 40° С.

Са <sub>3</sub> (РО <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Общее количество желатины В см <sup>3</sup>	Концентрация желатины В %	Через 15 мин.	Через 1 ч. 30 м.	Через 10 часов	Через 6 дней	
N/600	0,2	0,005	Конус Т.	Конус Т.	Конус Т.	Осадок	Примечание: Консервирующие вещества не были внесены
N/600	2,0	0,050	Тоже	»	»	Очень тонкая суспензия	
N/600	10,0	0,200	»	»	»	Очень тонкая суспензия	
N/600	Контрольн.	—	»	Суспензия	Осадок	—	

Через недельный промежуток при концентрациях желатини 0,050% и 0,200% образовались очень стойкие суспензии. Может быть, здесь налицо явление постепенной агрегации в вязкой среде раствора желатини. Приливание раствора желатини после образования  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  дало те же результаты, как и в опытах с  $\text{CaHPO}_4$ .

Таблица XXI

Опыт по введению желатини после сливания через 3 минуты

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Количество желатини в $\text{cm}^3$	В %	Содержание желатини в %	Характеристика системы			
				Через 5 мин.	Через 10 мин.		
N/600	0,1	0,1	0,00025	Конуст.	Осадок	Примечание: Раствор желатини не консервируется	
N/600	10	0,1	0,02	»	Конуст.		Через 5 дней очень тонкая суспензия
N/600	0,1	1,0	0,0025	»	»		Через 5 дней очень тонкая суспензия
N/600	1,0	1,0	0,025	»	»		
N/600	10,0	1,0	0,2	»	»		

Очень тщательно разработан вопрос защиты фосфатов кальциа желатини в работе G. M. De Toni<sup>1</sup> — «Ueber Kolloides Kalziumphosphat».

Оказывается, между концентрациями защищающего коллоида (желатини) и коллоидного фосфата кальциа существуют определенные соотношения, обеспечивающие защиту.

Автор изучал вопрос в области более высоких концентраций  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  — 0,0400, 0,0600, 0,0800 g — погм - mol в 1000  $\text{cm}^3$ , наши наблюдения проведены с концентрацией — 0,0033 g — погм - mol и преследовали только установление явления защиты.

Молочный сахар в качестве поддерживающего средства по отношению к  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  оказался сильнее, чем по отношению к  $\text{CaHPO}_4$ , при приливании перед образованием  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

\* Kolloid-Zeitschrift, XXVIII Band, 1921. 4 Heft, S. 145.

Таблица XXII

Сливается  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  в концентрациях N/300 с предварительным приливанием к каждому из них молочного сахара.

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Молочного сахара в концентрации N/4	Концентрация молочного сахара		Через 5 мин.	Через 8 мин.
	В $\text{см}^3$	В N	В %		
N/600	0,2	N/804	0,047	Конуса Т. нет	Конуса Т. нет
N/600	1,0	N/84	0,45	»	»
N/600	10,0	N/30	1,891	»	»
N/600	Контрольн.			Конус	Осадок

При концентрациях молочного сахара, начиная с N/804 или 0,047%, была обнаружена полная пептизация. К сожалению, не удалось провести дальнейших опытов по выяснению концентрации молочного сахара, едва поддерживающих  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  в растворе.

Раствор молочного сахара, прилитый после образования  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , поддерживал в концентрациях начиная с 1,89, т.-е. приблизительно в тех же, в которых он поддерживал  $\text{CaHPO}_4$ .

Таблица XXIII

Сливается  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  в концентрациях N/300 с последующим приливанием раствора молочного сахара.

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Количество молочного сахара В $\text{см}^3$	Концентрация молочного сахара		Через 5 мин. после прилив. сахара	Через 1 ч 30 м.	Через 12 часов.
		В N	В %			
N/600	1 N/400	N/16400	0,002306	Конус Т.	Грубая суспензия	Осадок
N/600	0,1 N/4	N/1604	0,0235	»	»	»
N/600	1,0 N/4	N/164	0,2306	»	Тонкая суспензия	Грубая суспензия
N/600	10,0 N/4	N/20	0,8910	»	Конус Т.	Конус Т. Через 5 дней конус не различим
N/600	Контрольн.			»	Грубая суспензия	Осадок

Интересно отметить, что постепенно шел процесс дробления (пептизации) частичек коллоида при концентрации молочного сахара в 1,89%.

Наконец, ниже в трех таблицах XXIV, XXV и XXVI приводятся результаты опытов с влиянием NaCl и Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до и после образования Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

Таблица XXIV

Опыт по предварительному и последующему приливанию N NaCl к Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Приливо перед сливанием	Приливо после сливания	Концентрация NaCl		Через 5 мин.	Через 30 мин.	Через сутки
	В см <sup>3</sup>	В см <sup>3</sup>	В N	В %			
N 600	10	—	N/5	1,40	Конус Т. очень слабый	Тоже	Конуса Т. нет
N 600	1	—	N/41	0,14	Конус Т.	»	Осадок
N/600	—	Сразу после слив. 10	N/5	1,40	Конус Т. очень слабый	»	Конуса Т. нет
N/600	—	Через 5 мин. 10	N/5	1,40	Тоже	»	»
N/600	Контрольная	—	—	—	Конус Т.	»	Осадок

Таблица XXV

Введение Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N/4 в Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> до сливания (в CaCl<sub>2</sub>).

Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Внесено Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> N/40 и N/4 в количестве	Концентрация Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Через 5 мин.	Через сутки
	В см <sup>3</sup>	В N	В %		
N/600	N/40 0,2	N/8100	0,004	Конус Тиндаля	Осадок
N 600	N/40 0,5	N/3240	0,01	» »	»
N/600	N/4 0,1	N/1604	0,0201	» »	»
N/600	N/4 1,0	N/164	0,1970	» »	»
N/600	N/4 5,0	N/36	0,890	Конуса нет	Пептизация полная
N/600	Контрольная	—	—	Конус Тиндаля	Осадок

Таблица XXVI  
Введение  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  N/4 в  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  после сливания.

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Прилито $\text{Na}_2\text{SO}_4$ N/40 и N/4	Через 5 минут	Через сутки	
	В $\text{см}^3$			
N/600	N/40 0,2	Конус Т.	Осадок	
N 600	N/40 0,5	» »	»	
N/600	N/4 0,1	» »	»	
N/600	N/4 1,0	» »	»	
N 600	N 4 5,0	Слабый конус Т.	Пептизация полная	
N 600	Контроль- ная	Конус Т.	Осадок	Прилито 5 $\text{см}^3$ $\text{Na}_2\text{SO}_4$ N/4. В течение первых суток пепти- зации не произошло

Как уже выше отмечалось, данные этих трех опытов совпали близко с данными опытов Б. А. Догадкина.

Вышеприведенный материал схематических (полуколичественного порядка) опытов дает возможность сделать следующие выводы:

1. Электролиты  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCl}$  и  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  по отношению к пересыщенным растворам  $\text{CaHPO}_4$  и  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  создают поддерживающие условия, причем наиболее сильные поддерживающие условия создает  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ .

2. При прилитии вышеуказанных электролитов, кроме  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , после образования  $\text{CaHPO}_4$  и  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , поддерживающие условия не создаются.

3. Молочный сахар, прилитый перед образованием  $\text{CaHPO}_4$  и  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , также создает поддерживающие условия.

4. Желатина, внесенная перед образованием  $\text{CaHPO}_4$  и  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  или после, создает явление защиты.

Настоящая работа проведена в лаборатории<sup>1</sup> проф. А. В. Думанского. Благодаря его руководящим указаниям и любезному содействию удалось создать необходимые условия для тщательного исполнения.

<sup>1</sup> Воронежский Сел.-Хоз. Институт.

## Folgerungen

1. Die Elektrolyten  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCl}$  und  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  erzeugen günstigen Bedingungen zur Unterhaltung der übersättigten Lösungen von  $\text{CaHPO}_4$  und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , besonders günstig wirkt  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ .
  2. Bei Zusatz obiger Elektrolyten,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ausgenommen, nach der Bildung von  $\text{CaHPO}_4$  und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  entstehen keine erhaltenden Bedingungen.
  3. Der Milchzucker, vor der Bildung von  $\text{CaHPO}_4$  und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  oder auch nach derselben hinzugefügt, bewirkt ebenfalls günstige Verhältnisse.
  4. Die Gelatine, vor der Bildung von  $\text{CaHPO}_4$  und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  oder nachher hinzugefügt, ruft Schutzerscheinungen hervor.
-



Бюллетень № 77

**НОВЫЙ МЕТОД НЕПОСРЕДСТВЕННОГО СЧЕТА  
КЛЕТОК ПОД МИКРОСКОПОМ В ОБЩЕМ  
ПЛАНЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УЧЕТА**

**Проф. С. А. КОРОЛЕВ**



# **Новый метод непосредственного счета клеток под микроскопом в общем плане микробиологического учета**

## **1. Критический обзор существующих методов счета**

Едва ли нужно доказывать, что при разрешении большей части задач практической микробиологии более или менее точный учет клеток, содержащихся в субстрате, является столь же необходимым методом работы, как точный весовой анализ в разрешении химических задач: бактериологу, как и химику, один только качественный анализ, не сопровождаемый количественным учетом, в огромном большинстве случаев дает очень мало. Поэтому разработка, усовершенствование и упрощение методов счета микроорганизмов всегда были одной из основных задач прикладной микробиологии.

К сожалению, однако, эта разработка до последнего времени велась преимущественно в узких рамках лишь одного в сущности метода, правда, в основе своей весьма целесообразного, но страдающего и весьма серьезными принципиальными недостатками, особенно заметными в применении к практическим запросам молочного дела. Таким господствующим методом, поставленным как бы вне конкуренции, и к которому все привыкли относиться с безусловным доверием, является метод учета клеток в субстрате путем посева определенного объема (или навески) этого субстрата в соответствующую твердую питательную среду и последующего подсчета выросших колоний. По существу своему, в принципе, этот метод, пожалуй, действительно заслуживает того пиетета, которым он до сих пор пользуется среди бактериологов. Его главные достоинства состоят в том, что 1) он является пока действительно единственным сколько-нибудь надежным методом учета исключительно живых клеток микроорганизмов, содержащихся в субстрате, так как счет ведется по колониям, а, понятно, эти последние могут вырасти только из живых клеток; 2) он дает возможность определять не только общее количество микроорганизмов, но и удельный вес качественно различных групп, или даже видов, с последующим выделением их в виде чистых культур для подробного изучения их биохимических особенностей (что особенно важно при разрешении задач прикладной микробиологии). В идее своей этот метод

действительно является той исходной базой, без которой не может обойтись ни одно сколько-нибудь серьезное бактериологическое исследование.

С другой стороны, однако, всякому бактериологу хорошо известно, что при практическом применении этого метода он наталкивается на целый ряд обстоятельств, ограничивающих его точность и применимость. Главнейшие из этих дефектов сводятся к следующему:

1. Хотя в основе метода лежит допущение, что число выросших на чашке колоний соответствует числу живых клеток, попавших на чашку из субстрата в момент посева, на самом деле это не совсем верно, а иногда и совсем неверно; это происходит по двум причинам, действующим в одном и том же направлении — в сторону уменьшения результата,—именно: а) клетки находятся в субстрате не всегда в обособленном состоянии, как отдельные клетки, а часто в виде более или менее значительных скоплений, кучек, как бы колоний; правда, при встряхивании жидкости в процессе приготовления «разжижений» часть этих скоплений разбивается на отдельные клетки, но далеко не все, и таким образом в чашках с твердой питательной средой фиксируются в определенных пунктах на ряду с отдельными клетками и скопления последних, которые при начавшемся размножении клеток дадут каждое по одной колонии, и, следовательно, в этой части материала число колоний будет соответствовать не числу отдельных клеток, а числу скоплений их, может быть и весьма значительных. В частности по отношению к молоку, наличность в нем значительных и трудно разъединяемых скоплений клеток может легко констатировать всякий, просматривавший ряд микроскопических препаратов из молока разного происхождения и разной свежести. Число и объем этих скоплений сильно меняются в зависимости от индивидуальных особенностей молока; его возраста и т. д., вследствие чего не представляется возможным внести какой-нибудь поправочный коэффициент для уменьшения этого постоянного источника ошибок. По исследованиям американского бактериолога Брида (Breed), величина ошибки, обусловленной этой причиной, может в отдельных образцах молока достигать 2500%, чаще всего, по его наблюдениям (для американского молока), колеблется в пределах 100 и 500%.

б) Не существует такой универсальной питательной среды и таких универсальных условий, которые допускали бы размножение всех попавших из субстрата живых клеток. Так, например, наиболее часто применяемые питательные среды—мясо-пептонный агар и желатина, рассчитанные преимущественно на рост обычных, мало специализированных сапрофитов, дают неполные числа для молочно-кислых бактерий (некоторые виды их вовсе не растут на этой среде) и дрожжей;

вовсе не проявляются при этом пропионово-кислые бактерии, а в аэробных условиях — и масляно-кислые. Применяя же специально подобранные среды для учета специализированных групп микроорганизмов, — например, солодовые среды для дрожжей, молочные — для молочнокислых бактерий, — мы не можем найти общее число живых клеток путем простого суммирования результатов, полученных на разных средах, так как почти никогда среда не бывает столь специфичной, чтобы совершенно исключать рост всех микроорганизмов, кроме узкой специфической группы (так на солодовом агаре растут не только дрожжи, но и многие бактерии, на молочных, кроме молочнокислых, — почти все обычные сапрофиты). Это органический дефект метода, и благодаря ему в некоторых случаях может существенно искажаться картина состояний микрофлоры, поскольку мы судим о ней по результатам учета колоний; в подобных случаях результаты эти приходится трактовать, как условные, соответствующие лишь строго определенным условиям опыта. Так, например, при исследовании микрофлоры старого сыра так называемое «общее число бактерий», учтенное по числу колоний на обычной мясо-пептонной среде, может часто оказаться меньше числа одних только молочнокислых бактерий, полученного при посеве на какую-нибудь специфическую среду; этот математический абсурд часто приводит в смущение начинающих исследователей, заставляя их подозревать наличие какой-нибудь грубой ошибки в своей работе, которой на самом деле может и не быть, — ошибка в самой сущности метода.

Кроме двух указанных основных и постоянных источников ошибок, имеется еще ряд менее существенных, которые однако могут сильно понижать точность метода, особенно в применении к разрешению некоторых специальных задач. Больше всего точность страдает от необходимости прибегать к «разжижениям» исследуемого материала перед его посевом, разжижениям подчас весьма значительным — до 10 000 000. Если принять во внимание некоторую неравномерность в распределении клеток в субстрате (особенно, если он твердый, как сыр, масло, и подлежит предварительному растиранию и эмульгированию) и наличие естественных скоплений их, то будет понятно, что высокие ступени разжижений могут значительно отклоняться от действительных средних величин; если к этому присоединить еще необходимость предварительного измельчения твердого субстрата в воде (сыр), то ошибка еще увеличится благодаря неполному измельчению массы, редко достигающему размера частиц, соизмеримого с размерами одной клетки. Наконец, по отношению к отдельным элементам микрофлоры, находящимся в меньшинстве, разжижения, рассчитываемые обыкновенно по числу господствующих элементов, приводят в конце концов к полному устранению «рецессивных» элементов

из учета; можно принять, что для элементов, составляющих менее 10% от общего числа, сколько-нибудь точный учет становится весьма ненадежным.

Все эти соображения необходимо учитывать при оценке возможной точности результатов исследования, так как преувеличенное представление о точности метода может привести к грубым ошибкам в выводах. Можно считать, что отклонение друг от друга результатов при подсчете различных посевов из одного и того же материала, достигающее 50 и даже 100%, является вполне законным, почти нормальным, не вызывающим каких-либо опасений относительно наличия грубых погрешностей в выполнении работы. В некоторых случаях неустрашимые колебания поднимаются и выше указанного предела, и в таких случаях приходится признать, что бактериологический анализ дает нам лишь масштаб явлений, порядок его величины, а отнюдь не действительную его величину; различие между какими-либо величинами даже вдвое часто не может быть оценено, как реальное различие.

3. Накопец, чрезвычайно важными недостатками чашечного метода являются его громоздкость и длительность всей процедуры от момента взятия пробы до получения результата. Чтобы представить себе громоздкость метода, достаточно вспомнить, что для анализа субстрата, в котором предполагается число живых клеток содержится в пределах от 100 000 до 10 000 000, довольно обычных для молока, — необходимо заготовить заранее: 1) три стерильных чашки Петри, 2) пять пробирок со стерильной водой, 3) шесть-семь стерильных пипеток, 4) три пробирки со стерильным агаром (если задача ограничивается определением лишь «общего числа»); если предполагаемые пределы численности выше—и притом шире раздвинуты, то число необходимых предметов приходится еще увеличивать. Другими словами, даже самый обычный, ходовой анализ требует для своего выполнения предварительного планирования и довольно сложной подготовки; одновременное же выполнение нескольких анализов всегда заставляет задумываться, — хватит ли посуды, материалов и проч. Длительность анализов по этому методу выражается в том, что подсчет колоний можно производить не ранее, чем через 2—3 суток после посева (по американским официальным нормам — через 7 дней). Конечно, из этого времени лишь небольшая часть будет затрачена на самую работу (в этом отношении метод вовсе не сложен—состоит из ряда довольно примитивных операций), но практически дело все же сводится к тому, что лишь через несколько дней можно дать бактериологическую оценку исследуемого материала, т.е. по отношению к молоку уже тогда, когда продукт несомненно уже использован потребителем. Следовательно, контрольные анализы молока по этому методу не могут служить целям браковки отдельных образцов молока перед его потреблением,

а лишь целям контроля над источниками снабжения молоком данного района. Отсюда вполне понятно, что для браковки отдельных образцов молока в момент их поступления в распределительный пункт практика давно изобрела ряд как бы суррогатов бактериологического исследования, которые дают лишь косвенные указания на объем и состав микрофлоры молока, — таковы различные варианты определения кислотности, редуктазная проба, пробы на брожение и проч. Одна из работ нашей станции (Н. В. Костровская — *Сравнительная оценка молока по различным «биологическим» пробам*) показывает, насколько отдаленны и неточны могут быть эти указания, как мало они соответствуют действительным отношениям в отдельных конкретных случаях. Но, как они ни плохи, они имеют громадное практическое преимущество перед методом учета колоний, давая ответ не через несколько дней, а через несколько минут или, самое большее, часов после взятия пробы; и пока не будет разработан способ счета микроорганизмов более простой и более быстрый, чем общепринятый способ счета по колониям, — до тех пор все эти «косвенные» способы оценки сохранят за собою известное право гражданства, как единственные применимые на практике.

На основании всего сказанного мы можем следующим образом формулировать главнейшие сильные и слабые стороны общепринятого способа счета микроорганизмов:

1. Этот метод является единственным и принципиально незаменимым в тех случаях, когда в субстрате предполагаются как живые, так и мертвые клетки, причем первые интересуют нас больше, чем вторые.

2. Точность метода в сильной степени ограничивается целым рядом причин, как лежащих в основе метода, так и более случайного характера; особенно она понижается по отношению к учету тех или других специфических групп, плохо проявляющихся на обычных питательных средах и в средних условиях опыта. Во всяком случае образцом точности этот метод служить отнюдь не может.

3. Громоздкость этого метода и слишком большая длительность анализа совершенно исключают пользование им в целях, так сказать, *предварительного* контроля, требующего немедленного ответа на вопрос о численности микроорганизмов. Если в научных исследованиях с этим недостатком еще можно мириться, то в практической работе контрольных лабораторий именно благодаря ему метод становится совершенно неприменимым при разрешении очень важных задач.

Как видим, метод учета микроорганизмов по числу выросших колоний, при всех его принципиальных выгодах, обладает и целым рядом существенных недостатков, во многих случаях сильно тормозящих работу, как практическую, так и научно-исследовательскую. Вполне естественна поэтому

неудовлетворенность им, чувствовавшаяся уже давно и вызывавшая ряд попыток к созданию нового метода, построенного на иных началах. Так, в качестве дополнения к «классическому» методу, в некоторых исследовательских работах стали снова применять старый листеровский способ «предельных разведений», который во многих специальных случаях—например, по отношению к молочнокислым бактериям—дает более надежные и более, так сказать, адекватные результаты, чем «классический» чашечный метод (напомню, что именно этим методом американские исследователи установили факт преобладания типа *Bact. casei* во второй половине процесса созревания чеддера, а работами Бактериологической станции ВМХИ тем же путем установлен этот факт и для других сыров). Однако этот последний метод по самому существу своему не может быть особенно точным,—ведь он определяет только вероятные пределы числа микроорганизмов,—и пределы обыкновенно довольно широкие.

Более заманчивой представляется идея *непосредственного счета клеток под микроскопом*. Правда, методы этого рода не могут претендовать на различение живых клеток от мертвых и повидимому одинаково учитывают как те, так и другие; но ведь в массе случаев,—и сюда относятся как раз все случаи исследования сырого молока, не достигшего еще резко выраженной стадии закисания,—это различие не имеет никакого практического значения, так как мы имеем дело почти исключительно с живыми, развивающимися элементами. В подобных случаях вышеуказанное принципиальное преимущество чашечного метода становится несущественным, и главное возражение против широкого применения методов непосредственного подсчета как будто отпадает. И если до последнего времени этого рода методы не пользовались особенной популярностью, то причина этого лежит, повидимому, не в существе их, а в недостаточно разработанной технике, что делало их и недостаточно доступными и недостаточно точными. Но что потребность в их разработке давно уже назрела, показывают хотя бы довольно многочисленные попытки, сделанные в этом направлении. Здесь прежде всего следует отметить, что в одной из областей микробиологии, имеющей дело с более крупными клетками,—именно по отношению к дрожжам,—метод непосредственного подсчета уже давно—еще со времени Е. Hansen'a получил вполне узаконенное право гражданства и едва ли не отгеснил здесь на второй план «классический» чашечный метод. Это объясняется тем, что благодаря крупным размерам клеток, позволяющим применять при микроскопировании оптические системы с малым увеличением и (в связи с этим) с большим фокусным расстоянием, оказалось возможным использовать для счета дрожжевых клеток приспособление, изобретенное для счета кровяных телец,—так называемый «гематиметр» в его различных модификациях (камеры Том а-Ц ей с с а, Т ю р к а и др.).



Это наиболее точный и совершенный способ микроскопического счета, не требующий никаких особых тонкостей в подготовке материала и приготовлении препарата (не требуется даже предварительного окрашивания) и дающий довольно точные результаты. Вполне естественно, казалось бы, подыскать такую модификацию метода, которая делала бы его применимым и к более мелким объектам, каковы клетки бактерий. Однако на практике это оказалось не так просто благодаря целому ряду непреодолимых технических затруднений, вытекающих именно из слишком малой величины наблюдаемых клеток: сколько-нибудь точное различение этих клеток возможно лишь при больших увеличениях, а следовательно при системах с минимальным расстоянием нижней поверхности объектива от наблюдаемого объекта; а между тем здесь к неизбежному расстоянию на толщину покровного стекла присоединяется еще глубина самой камеры, которая в современных счетных камерах имеет, как низший предел, 0,015 мм. Поэтому исключается пользование не только иммерсионными системами, но и более сильными «сухими» объективами, позволяющими отчетливо разглядеть бактериальные клетки. Кроме того, та же причина—слишком малый размер клеток—требует, как неперемного условия успеха, предварительного окрашивания этих клеток в жидкости (*in vitro*), а это значительно усложняет дело и не всегда удается.

Однако попытки применить счетную камеру («гематиметр») к счету бактериальных клеток все же делались. Так, следует упомянуть вариант этого метода, разработанный автором настоящей статьи применительно к учету бактерий в молоке (С. А. Королев—*О взаимодействии некоторых молочнокислых бактерий при их одновременном развитии в молоке*,—«Вестник Бактериолого-агрономической станции, № 19, Москва, 1912 г.). Однородность наблюдаемых элементов,—опыт велся с чистыми культурами,—допускала в данном случае значительную точность, однако автор не решился бы рекомендовать эту методику, как универсальную для учета смешанных микрофлор, да и вообще для учета любых объектов; чаще всего главное затруднение составляет здесь сравнительно слабая окрашиваемость клеток при окраске их в жидкости, что является необходимой особенностью метода. Сам я после выщелачиванной работы лишь изредка прибегал к этому методу (в случаях однородных микрофлор); насколько мне известно, им пользовался В. В. Минервин в своих исследованиях микрофлоры мочки льна—и повидимому с хорошим результатом. Во всяком случае, широкого применения метод счета бактерий в камере не получил.

Более многочисленны варианты метода непосредственного счета, положившие в основу свою микроскопирование высушенного, фиксированного и окрашенного препарата—мазка, приготовленного путем размазывания по определенной

площади предметного стекла определенного объема и исследуемой жидкости. По этому методу имеется довольно обширная литература, часть которой—до 1911 года—отмечена мною в вышецитированной статье. Среди авторов, выдвигавших в то время этот метод, упомянут между прочим американец Р. Брид (R. Breed), который и в настоящее время является одним из наиболее деятельных пропагандистов этого метода, в сотрудничестве с Бру, Доттерером (Brew a. Dotterer) и др.<sup>1</sup> Благодаря этой пропаганде данный вариант непосредственного подсчета уже успел приобрести в Америке довольно широкое распространение, особенно в деле бактериологического контроля и оценки рыночного молока.

Вариант, разработанный Бридом, сам по себе мало отличается от более старых вариантов,—некоторые изменения внесены лишь в способ отмеривания исследуемого материала, в способ ограничения площади мазка, в самую технику счета путем регулирования величины поля зрения. Но все же надо признать, что Брид и его сотрудники выполнили большое дело, показав, что в известных случаях метод непосредственного подсчета не только принципиально, но и практически ничуть не ниже «классического» метода по точности, между тем как его простота и быстрота получения результатов делают его во многих случаях незаменимым. В этом отношении особенно интересна последняя из перечисленных в примечании работ, в которой авторы провели целый ряд параллельных анализов по тому и другому методам и выяснили как степень точности обоих,—оказавшуюся приблизительно одинаковой,—так и причины расхождения результатов, а также источники ошибок. Причины расхождения результатов, получаемых по двум различным методам, оказались в общем именно те, которые перечислены мною выше,—неполное развитие разнородной микрофлоры при посеве на ту или иную питательную среду, наличие комочков (последнее в особенности). Обе эти причины действуют в одном и том же направлении—в сторону уменьшения результата при подсчете по «классическому» методу, и таким образом, так как эти причины не влияют на результат непосредственного подсчета, принципиально этот последний результат следует признать более близким к реальной величине, чем результат, получаемый по первому способу. Возможность ошибки в сторону увеличения результата—вследствие наличия мертвых клеток—при исследовании сравнительно свежего, сырого молока почти исключается по мнению цитируемых авторов, с чем едва ли

---

<sup>1</sup> 1. J. D. Brew a. R. Breed.—A new method of determining milk quality (Summarized by F. H. Hall). 1914, Geneva, N. J.

2. J. D. Brew a. W. D. Dotterer.—How bacteria in milk are counted (Summarized by F. H. Hall), Geneva, N. J.

3. R. S. Breed a. W. A. Stocking.—The accuracy of bacterial counts from milk samples. 1920. Geneva, N. J.

можно не согласиться. На основании всех своих исследований авторы приходят к заключению, что метод непосредственного подсчета, по крайней мере в применении к контролю сырого рыночного молока, не только не уступает «классическому» методу, но имеет перед ним решительные преимущества, — и не только в отношении большей простоты и скорости получения результатов, но и по существу, — в отношении близости получаемых результатов к реальным величинам.

Однако в этих же работах вскрываются и некоторые существенные технические недостатки нового метода, которые, вероятно, и препятствуют его всеобщему признанию. Эти недостатки сводятся главным образом к особой тонкости некоторых манипуляций; это ведет к тому, что точность получаемых результатов в сильной степени зависит от индивидуальных способностей аналитиков, от их, так сказать, «приработанности», их искусства. Конечно, всякий метод требует от работника известных способностей, известного навыка и опытности, но все же приходится признать, что метод, более чувствительный в этом отношении, требующий особенной тонкости работы, является менее совершенным, менее пригодным для всеобщего пользования. Главнейшие трудности бридовского метода относятся к следующим пунктам: 1) отмеривание жидкости производится минимальными дозами —  $0,01 \text{ см}^3$ , — что требует наличия специально приспособленных капиллярных пипеток и умения пользоваться ими; 2) еще важнее требование возможной равномерности толщины мазка и возможно точного ограничения его заранее очерченным контуром, так как подсчет ведется здесь, разумеется, не на всей площади, а лишь на немногих сравнительно, случайно попавшихся полях зрения (до 20); понятно, что близость вычисленной средней густоты клеток на поле зрения к реальной средней величине в сильнейшей степени зависит от равномерности в распределении этой густоты по всей площади мазка. И понятно, что степень этой равномерности и точность совпадения границ мазка с начерченными линиями — при требуемой методом быстроте работы — всецело зависят от индивидуального умения работника. Это отмечают сами авторы, сопоставляя в своем заключении результаты обоих методов. В виду принципиального значения этих выводов, я считаю уместным привести из них наиболее существенные выдержки:

«Чашечный метод умелому аналитику, пользующемуся надлежащей техникой, обычно дает возможность сделать достаточно точное «суждение» («estimates») о числе живых клеток в  $1 \text{ см}^3$  молока» (но вовсе не дает реального числа этих клеток, как доказывают те же авторы в другом месте). «Подобные же «суждения» о числе живых бактерий и групп могут быть получены и путем микроскопического наблюдения, предполагая, что в данном образце нет ни слишком крупных

комочков, ни мертвых клеток»... «Благодаря наличности комочков чашечный метод всегда дает «оценку» («estimates») числа клеток, меньшую истинного числа клеток»... «В применении к молоку со смешанной микрофлорой (разной величины комочки) ошибка при этом может достигать 100, 200 и даже 1000%»... «Сравнительные анализы показали, что имеется вероятность по крайней мере, как 1 : 3, что (при чашечном способе) молоко, в котором «сосчитано» 50.000 бактерий, фактически содержит их меньше, чем молоко, в котором «сосчитано» 40 000 бактерий»... «эта вероятность извращений уменьшается по мере раздвигания границ между сравниваемыми величинами»... «В противоположность этому при микроскопическом подсчете на первый план выдвигаются искусство и терпение аналитика».

Особенность своего метода, отмеченную подчеркнутой мною фразой, сами авторы не считают, правда, особенно существенной. Но я полагаю, что именно эти недостатки мешали широкому использованию этого метода; по крайней мере, я лично, насколько не сомневаясь в возможности получать этим методом прекрасные результаты, никогда не решался рекомендовать его, как обыденный, ходовой прием исследования,—и именно в силу его чрезмерной «тонкости».

Другие варианты, предлагавшиеся разными авторами, которые вносили те или иные изменения в отдельные подробности метода, не затрагивали этого коренного недостатка. Таков, например, вариант Олава Скара (O. Scar—Mikroskopische Zahlung u. Bestimmung des Gesamtkubikinhalts der Mikroorganismen u. s. w.—CfB. Bd. 57, 1922, 14—17); в нем детально разработана методика окрашивания препарата с применением окрашивания *in vitro* (в жидкости),—несколько изменены приемы ограничения площади мазка, площади поля зрения и т. п., но сущность осталась та же: подсчет среднего числа клеток в отмеренной минимальной массе мазка на основании ряда фактических подсчетов в нескольких определенно ограниченных полях зрения.

Наконец, в недавнее время в специальной литературе снова начала выдвигаться уже ранее предложенная модификация Фроста (Frost)—так называемый метод «микрокультур», представляющий как бы комбинацию обычного коховского чашечного метода с бридовским методом; этот вариант более подробно разработан Кларенбургом (см. A. Clarenburg—Recherches systématiques sur la méthode Frost des petites cultures sur lames—«Le Lait», 1927, № 64).

Сущность метода Фроста состоит в следующем: 0,1 см<sup>3</sup> исследуемой жидкости смешивается на стерилизованном предметном стекле с каплей расплавленного питательного агара и быстро (равномерно) размазывается на площади в 5 см<sup>2</sup>, заранее точно очерченной. После застывания препарата он заключается

во влажную камеру (с предосторожностями против заражения извне) и ставится на 6—10 часов в термостат. В этот срок из попавших в препарат зародышей успевают образоваться микроскопические колонии, которые можно уже считать под микроскопом; само собою разумеется, что и здесь не пересчитываются все колонии, выросшие на мазке, а просчитывается лишь несколько отдельных полей зрения; отсюда вычисляется средняя величина для одного поля, которая пересчитывается затем на всю площадь мазка, заключающего, как сказано, определенный, отмеренный объем исследуемого материала. Для облегчения счета мелких колоний автор рекомендует предварительно обрабатывать препарат посредством высушивания, фиксирования и окрашивания метиленовой синькой. При таких условиях возможен учет минимальных, только что наметившихся колоний. Как преимущества этого метода, выдвигаются: 1) его меньшая громоздкость по сравнению с обычным чашечным методом, 2) значительное сокращение промежутка времени от момента посева до момента подсчета (вместо 2—3 суток—6—10 часов).

Однако едва ли нужно доказывать, что вместе с преимуществами бридовского метода этот способ присвоил себе и его недостатки (трудность отмеривания слишком малых количеств материала, затруднения в получении вполне равномерного мазка и пр.).

Подводя итоги этому краткому обзору современных методов счета микроорганизмов, приходится признать, что, несмотря на многочисленные попытки, — частью весьма остроумные и даже до известной степени удачные, — до сего времени не удалось создать метод, который, устраняя недостатки «классического» чашечного метода, был бы способен конкурировать с ним по элементарности и общедоступности техники выполнения. Повидимому именно в этом надо видеть причину того, что чашечный метод, при всех его недостатках, при всей его громоздкости, все же продолжает оставаться наиболее распространенным, ходовым, рабочим методом, как в научных, так и в контрольно-аналитических исследованиях.

Такое положение вещей уже давно заставляло меня задумываться над задачей отыскания новых принципов для построения рабочего метода счета микроорганизмов. Года два тому назад, просматривая иностранную литературу за время войны, я встретил одну небольшую заметку по данному вопросу, повидимому, не обратившую на себя особого внимания со стороны широких кругов специалистов. Вот эта заметка и дала мне толчок к разработке нового метода, описание которого составляет предмет настоящей статьи. Эта заметка — реферат сообщения Дрейера (G. Dreyer) в американском журнале *Journal of Americ. Medic. Assoc.* Vol. 77, 1921 г. (реферат в *Centralblatt f. Bakteriologie*, II Abt., Bd. 57, 18 - 24). В ней

чрезвычайно лаконично сообщается, что указанный автор предложил для подсчета кровяных телец... и бактерий «следующий способ: содержащие ядра («kernhaltige») клетки бактерий фиксируются сулемой, три раза промываются физиологическим раствором; затем в физиологическом растворе с прибавлением небольшого количества формалина готовится стандартная суспензия, содержащая 30 000 этих клеток в 1 куб. миллиметре. Для подсчета клеток в исследуемом материале 1 часть стандартной суспензии смешивается с 1 частью исследуемого материала (если нужно, после надлежащего разведения) и 1 частью 0,5% метиленовой синьки. В ряде полей зрения подсчитываются отдельно с одной стороны клетки суспензии, с другой — клетки исследуемого субстрата; таким образом определяется относительное число последних по отношению к числу наблюдаемых клеток суспензии. Отсюда, принимая во внимание «титр» суспензии, легко вычисляется абсолютное число клеток в исследуемом материале».

Вот все, что можно было извлечь из цитированной заметки, оригинальной же статьи я не имел в своем распоряжении. Какие именно клетки (какого вида микроорганизмов) использовал Дрейер для приготовления стандартной суспензии, остается, как видно, совершенно невыясненным, — а в этом ведь и заключается ключ к практическому применению метода. Однако самая идея нового метода была совершенно ясна, и эта идея с первого же взгляда показалась мне чрезвычайно плодотворной. В самом деле, принцип, выдвинутый Дрейером, должен повидимому устранить наиболее уязвимые места бридовского метода, — именно: 1) затруднения, связанные с отмериванием минимальных количеств жидкости, так как количество материала, взятого для приготовления мазка, может быть здесь совершенно произвольным; определенными должны быть лишь объемы при смешении исследуемой жидкости и стандартной суспензии, но эти объемы нет надобности сокращать до минимума, во всяком случае их можно брать не менее 1 см<sup>3</sup>. 2) Не имеет здесь также никакого значения точное ограничение площади, по которой распределяется материал на предметном стекле, так как искомой величиной является здесь не абсолютное число клеток в известном объеме, а отношение между числами разнородных, легко различимых элементов, наблюдаемых в произвольных полях зрения. 3) По той же причине (замена абсолютных величин относительными) несущественным становится здесь и одно из наиболее важных требований метода Брида, — от которого больше всего зависит точность получаемого результата, и в то же время наиболее трудно выполняемого на практике, — требование возможно точной равномерности в толщине мазка.

Учитывая все эти несомненные преимущества принципа Дрейера, я взял на себя задачу найти для него конкретную форму, пригодную для широкого использования. Эта задача

состояла в том, чтобы подобрать наиболее подходящий материал для приготовления стандартной суспензии. Как видно из изложенного, этот материал должен удовлетворять следующим основным требованиям: 1) частицы этого материала,—независимо от того, являются ли они клетками микроорганизмов или какими либо неорганизованными частицами,—должны обладать какой-либо своеобразной формой или какими-либо особенностями внутреннего строения, легко различимыми под микроскопом, вообще должны быть так или иначе легко отличимы в смешанном препарате, в котором на ряду с ними находятся всевозможные микробиологические элементы (клетки бактерий, дрожжей, плесеней, споры всех этих микроорганизмов). 2) Они должны обладать свойством равномерно, поодиночке распределяться в жидкости, без сколько-нибудь заметной тенденции к образованию комочков, скоплений (вследствие агглютинации или других, коллоидно-химических факторов). 3) Наконец, искомый материал должен быть легко доступен в значительных количествах, так как только при этом условии обеспечивается общедоступность метода.

Исходя из первого требования (легкая различимость), я с самого начала остановил свое внимание на клетках дрожжей; если, вообще говоря, они и мало характерны по форме и строению при сопоставлении с дрожжевыми же клетками (других видов), то во всяком случае порядок величины позволяет легко отличать их от любых бактерий (за исключением разве азотобактерий); отличимость же от других дрожжевых клеток я предполагал возможным осуществить путем какой-либо специфической окраски. Но, как известно, дрожжи плохо удовлетворяют второму из указанных требований,—в большинстве случаев они в весьма сильной степени обладают склонностью образовывать скопления, как бы колонии, подчас состоящие из довольно значительного числа клеток, и это, конечно, нарушает принцип равномерности в распределении. Кроме того, и способ размножения большей части дрожжей — путем почкования—должен повидимому чрезвычайно затруднять индивидуализацию отдельных клеток и сильно увеличивать ошибки счета. Однако, в обширной коллекции дрожжей, которою располагает наша станция, мне удалось найти виды, почти свободные от указанного недостатка,—это виды из рода *Schizosaccharomyces*, которые, как известно, и как это отмечено в самом названии,—резко отличаются от всех остальных дрожжей своим способом размножения: они не почкуются, а делятся пополам, «дробятся» подобно бактериям. Благодаря этой особенности они не обнаруживают и специфической для дрожжей склонности к образованию колоний, клетки их располагаются в субстрате, как правило, поодиночке, — в худшем случае встречаются небольшие случайные скопления из 2—3—4 клетки. Кроме того, они—особенно один из видов, именно *Schizosaccharomyces*

rombe, обладают и некоторым своеобразием формы, позволяющим в большинстве случаев довольно легко отличать их— даже в неокрашенном виде — от клеток обычных наших дрожжей. Вот все это и заставило меня в конце концов остановиться, как на материале для приготовления суспензии, именно на только что названном виде этого рода дрожжей. *Schizosaccharomyces rombe* экзотические—африканские дрожжи, выделенные из негритянского пива. Это обстоятельство делает их еще более пригодными для приготовления стандартной суспензии, так как благодаря этому вероятность встретить этот вид в каком-либо из наших продуктов—особенно в молочных—практически равна нулю. Да и вообще схизосахаромицеты встречаются весьма редко, и вероятность встретить их среди клеток аборигенных дрожжей в каком-нибудь исследуемом материале,—что могло бы повести к ошибкам в счете,—вообще говоря ничтожна. Впрочем в дальнейшем мне удалось найти прием, с помощью которого безошибочно можно отличать клетки стандартной суспензии от клеток того же вида дрожжей, внесенных в субстрат помимо суспензии; этот прием будет указан при детальном описании метода.

## II. Описание нового метода

### 1. Приготовление стандартной суспензии

Способ приготовления стандартной суспензии в сущности своей весьма прост, хотя и требует, конечно, большой точности, в силу чего выполнение этой операции, мне кажется, было бы целесообразнее предоставить более авторитетным центральным лабораториям. Испытав ряд вариантов, я остановился в конце концов на следующем (в описании метода, помещенном в № 23 «Молочного хозяйства», изложен более ранний вариант, что, конечно, несколько не меняет сущности самого метода). Культура названных дрожжей выращивается в нужном количестве (на 1 литр суспензии, содержащей 10.000.000 клеток в 1 см<sup>3</sup>, расходуется 5—6 пробирок культуры) на агар-агаре из пивного суслу; в момент максимального развития, пока еще не начались спорообразование и предшествующая ему конъюгация клеток—через 1—2 суток выдержки в термостате при 30° С—культура смывается с поверхности агара дистиллированной водой, полученная суспензия тотчас кипятится,— чтобы убить клетки и в то же время растворить случайно попавшие при смывании частички агара,—после чего распределяется по пробиркам для центрифугирования и многократно промывается сменяющимися порциями воды. По удалении последней промывной воды к осадкам приливается раствор какого-либо достаточно сильного антисептика, — я пользуюсь обыкновенно 5% раствором фенола. но, вероятно, не худшие результаты дала бы сулема, — и вместе с этим раствором все осадки из пробирок



сливаются вместе в одну общую колбочку — для окрашивания. Последнее впрочем необязательно, и в более ранних вариантах метода я обходился без него, — в таком случае прибавлением антисептика приготовление суспензии заканчивается, остается только подсчитать в ней число клеток и, сообразно с этим, путем разбавления подогнать суспензию к определенному титру. Однако окрашивание клеток суспензии настолько облегчает пользование методом, что в настоящее время я всегда przygotowляю окрашенную суспензию. Перед окрашиванием суспензии нужно дать отстояться и излишек жидкости по возможности слить с осадка. Вместо удаленной жидкости на осадок наливается значительный избыток — по крайней мере 20-кратное количество по объему — насыщенного отфильтрованного спиртового раствора Methyl-violet, разбавленного в 8—10 раз 5% карболовой водой. После этого путем сильного встряхивания осадок равномерно распределяется в краске (следить, чтобы не было комочков), и содержимое колбочки осторожно нагревается почти до кипения. Затем жидкость снова разливается по пробиркам для центрофугирования, посредством которого осадок освобождается от красящего раствора и промывается раза 2—3 сменяющимися порциями воды; последняя порция по удалении заменяется раствором фенола, который после отстаивания должен иметь лишь слабый фиолетовый оттенок (нет надобности доводить до полного обесцвечивания). Окрашенные таким способом клетки (если краски было взято достаточно) в фиксированном мазке при рассматривании с иммерсионной системой должны иметь интенсивную темно-фиолетовую окраску, а в препарате с нигротином — ярко-рубиновую на темном фоне.<sup>1</sup> Если окраска получилась недостаточно интенсивная, то необходимо всю операцию окрашивания повторить.

После промывания все порции сливаются вместе, и объем доводится прибавлением 5% фенола до какой-либо определенной величины — например, до 1 литра, но во всяком случае так, чтобы густота суспензии оставалась выше той, которую желают в конце концов получить. Теперь остается только путем ряда подсчетов в камере Thomas установить среднее число клеток, содержащихся в 1 см<sup>3</sup> данного разведения, и, исходя из полученной величины, разбавить 5% фенолом до желаемого «титра». Наиболее удобной величиной последнего я считаю 10 000 000 клеток в 1 см<sup>3</sup>. Для каких-либо специальных целей может оказаться более целесообразным установление какого-нибудь другого титра, что, конечно, не представляет никаких затруднений. После установки и окончательной проверки титра полезно прибавить к суспензии небольшое количество насыщенного раствора краски (2—3 см<sup>3</sup> на 1 литр), так как на основании опыта я убедился, что благодаря этому интенсивность и прочность окраски клеток значительно возрастают.

<sup>1</sup> Особенно яркий оттенок получается при искусственном освещении.

Приготовленная таким образом суспензия обладает неограниченной, повидимому, прочностью: по крайней мере при хранении ее в течение нескольких месяцев не наблюдалось никаких изменений ни в степени окрашенности клеток, ни в титре.

## 2. Приготовление смеси для препарата

Если мы имеем дело с жидким субстратом, то приготовление смеси не требует никаких специальных приемов. В целях упрощения вычислений удобнее всего смешивать исследуемый материал и суспензию в равных объемах; я беру всегда по 1 см<sup>3</sup> того и другой, отмеривая обыкновенной пипеткой при помощи маленького каучукового баллончика, надетого на пипетку; пипетки употребляются нестерильные, но, во избежание ошибок от видимого под микроскопом загрязнения суспензии, рекомендуется для той и другой жидкостей всегда употреблять различные пипетки. Непосредственно перед каждым отмериванием суспензия должна тщательно взбалтываться, так как дрожжевые клетки довольно быстро оседают, чем нарушается однородность суспензии и изменяется ее титр. Отмеренные количества исследуемой жидкости и суспензии вливаются в одну и ту же маленькую пробирку (удобны, например, те, которыми пользуются для наблюдения агглютинации), где и смешиваются путем сильного встряхивания (отверстие пробирки при этом затыкается просто пальцем, так как соблюдение правил стерильности в этом методе вообще является излишним). Отсюда тотчас после встряхивания платиновой петлей берется нужной величины капля для приготовления мазка. Однако нет необходимости готовить препарат тотчас после приготовления смеси,—и это составляет одно из весьма важных преимуществ метода: дело в том, что смесь содержит настолько крепкий раствор антисептика—например, 2½% фенола,—что если и не создается абсолютной стерильности, то, во всяком случае, какое либо размножение клеток совершенно исключается. Я не делал систематических опытов для точного выяснения вопроса о стойкости смеси, однако не раз мне приходилось наблюдать ее абсолютную неизменяемость—в отношении результатов последующего счета клеток—в течение недели и больше. Легко понять, насколько выгодна эта особенность метода при организации массового контроля над молоком на местах его производства. Взятие проб может быть поручено при этом лицу, не имеющему даже особенно высокой квалификации,—от него требуется лишь достаточная аккуратность. Это лицо, снабженное достаточным количеством пробирок с пробками, двумя пипетками и надлежащим запасом суспензии, собирает лишь пробы в виде вышеуказанной смеси и доставляет их в лабораторию для микроскопического исследования. В случае надобности пробы в таком виде могут пересылаться даже по почте. То обстоятельство, что по самой сущности метода никакой стерили-

главной задачи (сравнение результатов двух методов), но я уже говорил, что этот прием вносил некоторую неопределенность в оценку числа клеток и должен был понизить точность счета. Между тем принципиально, безотносительно, нет необходимости вводить это условие в метод; я скажу даже больше: введение его лишает новый метод одного из существенных преимуществ, которые он имеет по сравнению с чашечным методом. В самом деле, ведь оценка молока по интенсивности бактериальных процессов,—каковую цель и ставит себе всякий бактериологический анализ,—должна базироваться на учете содержащейся в молоке бактериальной массы; первым приближением к решению этой задачи является учет всех содержащихся в молоке отдельных клеток, независимо от того, образуют ли они скопления или содержатся в виде разъединенных клеток. Конечно, еще больше приблизила бы нас к поставленной цели оценка не только числа клеток, но и их объема,—мысль, выдвигаемая О. Скарром в вышеупомянутой его работе, описывающей вариант метода непосредственного счета; эту мысль (и технические приемы, предложенные автором для ее осуществления) следовало бы весьма приветствовать, если бы техника подобного учета была достаточно проста и доступна; к сожалению, она, по-моему, слишком сложна для того, чтобы стать ходовым приемом бактериологического исследования. Но во всяком случае следует признать, что чашечный метод, неизбежно учитывающий скопления клеток наравне с отдельными элементами, особенно далеко уклоняется от желательной пропорциональности между оценкой молока и величиной бактериальной массы. Метод непосредственного подсчета принципиально может быть свободен от этой ошибки,—но, понятно, лишь при том условии, если за единицу счета всегда будет принимать всякую вполне сложившуюся клетку, независимо от ее участия в образовании скоплений; и это правило должно неуклонно проводиться не только по отношению к так называемым «случайным» скоплениям клеток («кучки»), но и к более прочным, «органическим» их объединениям, как цепочки, сарциноподобные образования и т. д. Конечно, точное соблюдение этого правила на практике нередко наталкивается на значительные затруднения: так, не всегда легко можно решить,—особенно это относится к случаям стрептококковых образований,—является ли тот или другой элемент (в данном случае членик цепочки) вполне сложившейся клеткой, или это еще часть клетки, находящейся в процессе деления; точно так же точный счет клеток становится довольно затруднительным в случаях больших, компактных скоплений, в которых клетки слишком заслоняют друг друга. Но все же несомненно, что мы гораздо ближе подойдем к реальной величине, если при учете члеников какого-нибудь стрептококка, состоящего из десятка клеточек, ошибемся даже вдвое (примем 5 клеток вместо 10), или если скопление,

состоящее из сотни элементов, оценим приблизительно в 50 клеток,—чем если в том и другом случаях будем считать просто по единице. Само собою понятно, что расхождение результатов двух методов при таком способе счета будет еще больше, чем наблюдалось в работе Е. Н. Измайловой, но я полагаю, что это отнюдь не должно вызывать каких-либо сомнений в правильности нового метода: чашечный метод ведь не может служить мерилom точности; правда, его условная точность, измеряемая однородностью отдельных подсчетов, как мы видели, несколько больше, чем при новом методе, но это его преимущество с избытком покрывается той ошибкой, которая коренится в самой его сущности. И метод непосредственного подсчета в этом отношении заслуживает безусловного предпочтения. Конечно, область случаев, в которых принципиально возможно его применение, требует более тщательного исследования—главным образом, в отношении роли мертвых клеток (кое-какие соображения на этот счет будут приведены ниже), но уже в настоящий момент я решаюсь с уверенностью сказать, что во всяком случае в области контрольных анализов сырого молока, а также при чисто научных исследованиях процесса размножения в развивающихся культурах новый метод, как орудие исследования, может быть поставлен на первое место. В особенности во втором из только что указанных направлений работы я многократно имел случай убедиться в его чрезвычайной целесообразности, позволяющей в несколько часов и с минимальной аппаратурой выполнять работы, которые при чашечном методе потребовали бы нескольких дней и весьма громоздкого набора приспособлений. Таким образом, в чрезвычайной важной и интересной—и, надо сказать, весьма мало исследованной—области биометрии и биографии микроорганизмов, новый метод открывает неожиданно широкие перспективы, позволяя развернуть объем работы до пределов, совершенно немислимых при чашечном методе.

## 2. Выяснение применимости нового метода в исследовании микрофлоры созревающих сыров и разработка техники этого применения.

На эту тему выполнена дипломная работа студентом ВМХИ Г. Х. Жаботинским, результаты которой я в дальнейшем и сообщаю. Но первая попытка в этом направлении еще раньше была сделана мною, и хотя она была проведена бегло, между делом, она дала весьма благоприятные результаты, что и побудило меня предложить Г. Х. Жаботинскому взять на себя более детальную техническую разработку метода в данной области.

Сначала остановлюсь на относящихся сюда результатах моей предварительной работы. Она состояла в следующем: во время проведения всеми работниками нашей станции одной большой коллективной работы по изучению микрофлоры созревающего голландского сыра, одновременно со взятием проб для обычного

анализа путем посева на чашки Петри, я из тех же материалов (молоко, сыр) брал отдельные навески, фиксировал их тем или иным способом и затем в свободное время (иногда спустя несколько дней) подвергал микроскопическому исследованию. Фиксирование проб состояло по отношению к молоку в смешении 1 см<sup>3</sup> пробы с 1 см<sup>3</sup> титрованной суспензии, которая, как выше указано, в основе своей представляет 5% раствор фенола, следовательно, полученная смесь содержала всегда 2,5% этого антисептика, что должно было гарантировать прекращение в смеси каких-либо бактериальных процессов, хотя, быть может, и не полные вымирание клеток. Предварительная обработка проб сыра имела задачей не только фиксирование, но и возможное обезжиривание проб, что достигалось выдерживанием проб сначала в спирте (от одного до 10 дней), а затем (после удаления спирта) в эфире. Непосредственно перед анализом проба извлекалась из эфира и, после испарения последнего, подвергалась тщательному растиранию в стеклянной ступочке с минимальным количеством воды (около 2 см<sup>3</sup>); растертая масса небольшими порциями воды смывалась затем в маленький градуированный цилиндр, в котором в конце концов объем жидкости доводился до 20 см<sup>3</sup>. Таким образом полученная эмульсия содержала всегда 1 г сыра в 20 см<sup>3</sup> жидкости. Из этой эмульсии приготавливалась затем обычным путем смесь (1 см<sup>3</sup> эмульсии на 1 см<sup>3</sup> суспензии дрожжей). В целях достижения большей однородности препарата, я пробовал вначале (непосредственно перед приготовлением последнего) прибавлять в смесь 1—2 капли аммиака (для растворения хлопьев белка); однако во многих случаях после этого клетки в препарате плохо окрашивались, что сильно затрудняло счет и во многих случаях приводило к явному понижению числа сосчитанных клеток. В виду этого указанный прием пришлось оставить, ограничиваясь лишь тщательным взбалтыванием смеси непосредственно перед намазыванием препарата. В остальной техника работы была, как описано выше. Препараты, полученные таким образом, не были достаточно однородны: на ряду с отдельными клетками, расположенными на бесцветном фоне, встречалось не мало бледно-окрашенных белковых масс, включающих в себе то или иное количество ярко-окрашенных клеток. Так как и эту работу я предполагал провести в условиях, наиболее сближающих результаты обоих методов, и исходя из мысли, что все клетки, включенные в одну и ту же обособленную белковую массу, при последующем посеве на чашку в общем будут давать одну колонию, я старался, насколько это было возможно, учитывать каждую такую массу как единицу, независимо от того, сколько клеток она в себе включает; и, как в вышеизложенной работе Е. Н. Измайловой, это должно было, конечно, отразиться невыгодно на точности счета. При подсчете я обращал внимание

на морфологический характер наблюдаемых элементов, ведя особый счет палочковидных клеток. Результаты этой работы были сопоставлены затем с результатами параллельно проведенных анализов по обычному чашечному методу. Это сопоставление выражено в следующей таблице:

Таблица IV  
(Числа бактерий в тысячах в 1 л)

НАЗВАНИЕ ПРОБЫ	Подсчет в чашках	Подсчет под микроск.
Молоко до заквашив. . . . .	26 700	27 000
» после заквашив. . . . .	—	40 000
Зерно из котла . . . . .	744 000	515 000
Сыр тотчас после формов. . . . .	3 370 000	3 006 000
» 1 суточн. без посолки . . . . .	2 200 000	2 500 000
» 1 » с посолкой . . . . .	1 928 000	1 908 000
» 2 » без посолки . . . . .	2 000 000	2 500 000
» 2 » с посолкой . . . . .	2 248 000	2 250 000
» 3 » без посолки . . . . .	2 200 000	3 080 000
» 3 » с посолкой . . . . .	2 654 000	4 934 000
» 5 » без посолки . . . . .	2 800 000	3 195 000
» 5 » с посолкой . . . . .	2 338 000	4 955 000
» 7 » без посолки . . . . .	2 600 000	3 150 000
» 7 » с посолкой . . . . .	2 289 000	5 040 000
» 10 » без посолки . . . . .	2 900 000	2 500 000
» 10 » с посолкой . . . . .	2 289 000	3 780 000
» 15 » без посолки . . . . .	—	3 620 000
» 15 » с посолкой . . . . .	2 134 000	5 500 000
» 20 » без посолки . . . . .	1 770 000	4 310 000
» 20 » с посолкой . . . . .	1 876 000	6 200 000
» 30 » без посолки . . . . .	990 000	4 425 000
» 30 » с посолкой . . . . .	1 231 000	3 000 000
» 45 » без посолки . . . . .	975 000	2 160 000
» 45 » с посолкой . . . . .	565 000	2 333 000
» 60 » без посолки . . . . .	835 000	1 111 000
» 60 » с посолкой . . . . .	381 000	2 900 000
» 90 » без посолки . . . . .	70 000	3 700 000
» 90 » с посолкой . . . . .	113 600	1 600 000

Как видим, в начальных стадиях процесса результаты обоих методов довольно близки один к другому. Но, начиная с третьего дня, наблюдается все большее и большее расхождение: в то время как по непосредственному подсчету число бактерий продолжает заметно возрастать до 20-дневного возраста сыра и с этого лишь момента начинает быстро падать к концу процесса, по данным чашечного метода довольно быстрое падение начинается уже с третьего дня и продолжается с некоторыми колебаниями до конца.

Подобные же соотношения наблюдались и в работе Г. Х. Жаботинского, проследившего изменения микрофлоры в трех сырах разных варок. Указанное расхождение, вообще говоря, настолько значительно и постоянно, что его нельзя, конечно, объяснить случайными ошибками метода, а лишь постоянно действующей причиной, коренящейся в самой сущности исследуемого процесса или метода. Объяснение, которое прежде всего естественно напрашивается, состоит в том, что уже после третьего дня начинается катастрофическое вымирание микрофлоры сыра, причем в микроскопическом препарате мы продолжаем учитывать как живые, так и мертвые элементы, в то время как чашечным методом учитываются, конечно, только первые,—отсюда и расхождение между показаниями двух методов. Что вымирание клеток в процессе созревания сыров с известного момента действительно происходит, едва ли приходится сомневаться; однако я всегда склонен был думать, что чашечный метод устанавливает этот момент значительно раньше, чем он в действительности наступает. На эту мысль наводило меня сопоставление данных чашечного метода с данными метода предельных разведений в молоке; последние, уже начиная с первых дней процесса (3—4—5), почти во всех нормальных случаях резко расходятся с первыми, превышая их часто в несколько раз; только к самому концу процесса кривые изменений микрофлоры, полученные по обоим методам, обыкновенно снова сближаются. Эти давно уже отмеченные соотношения я объяснял себе тем, что с известного момента в микрофлоре сыра появляются элементы, хотя и живые, вполне способные расти в молоке, но неспособные давать колонии в чашках с мясо-пептонным агаром. Так как по посевам в молоко мы учитываем исключительно различных более или менее типичных представителей группы молочно-кислых бактерий—на эту задачу, ведь, и рассчитан самый метод,—то именно среди представителей этой группы, очевидно, и приходится предполагать те элементы микрофлоры, которые растут в молоке, но не растут в мясо-пептонном агаре. При исследовании микроорганизмов, получающих преобладание в молоке при посевах высших разведений сырной массы, подобные элементы действительно попадают очень часто, особенно среди палочковидных форм, которые я обычно объединяю под общим

термином *Bact. casei*. Как известно, для многих представителей этого типа отсутствие роста на чашках с мясо-пептонным агаром является характерной особенностью: и как раз этот тип всегда выдвигается, а в большинстве случаев получает и перевес во второй половине процесса созревания сыра. Кроме того, есть основание думать, что многие клетки нормального типа *Streptococcus lactis*, вообще говоря, способного давать колонии на чашках с мясо-пептонным агаром, после длительного пребывания в созревающем сыре теряют эту способность (при непосредственном посеве), сохраняя в полной мере способность размножаться в молоке, развивая в нем нормальный процесс кислото-образования. На эту мысль наводит меня одно наблюдение над смешанными культурами *Strept. lactis* и молочных дрожжей: если после многомесячной выдержки этих культур сделать из них посев непосредственно в чашку с мясо-пептонным агаром, то в большинстве случаев роста колоний *Str. lactis* вовсе не наблюдается,—прорастают только дрожжи; между тем посев одной петли той же старой культуры в стерильное молоко сразу же дает вполне нормальную картину молочно-кислого процесса (процесс свертывания почти не замедляется по сравнению с нормальной свежей культурой). Исходя из всех этих соображений, я всегда склонен был думать, что чашечный метод дает картину изменений микрофлоры, более или менее соответствующую действительности, лишь в первые дни процесса, когда 1) палочковидные формы почти отсутствуют, и 2) клетки *Strept. lactis* находятся еще в нормальном своем состоянии; в дальнейшем же ходе процесса более адекватную картину его,—хотя по самой сущности своей, быть может, и недостаточно точную в смысле плавности хода кривых,—должен давать метод предельных разведений при посевах в молоко, так как он может учесть не только все клетки типа *Bact. casei*, но и клетки *Strept. lactis*, частично ослабленные в своей жизнеспособности.

Все эти соображения находят себе неожиданное подтверждение в результатах непосредственного подсчета как в моей предварительной работе, так и в работе Г. Х. Жаботинского. В самом деле, сопоставляя эти данные с данными, полученными методом предельных разведений, мы убеждаемся, что по своему масштабу те и другие чрезвычайно близки для всего периода с первого до 20-го—25-го дня, и лишь с этого момента они начинают заметно расходиться—быть может, в связи с действительно начавшимся быстрым вымиранием клеток. Вместе с тем, начиная с 20-го дня, непосредственный подсчет констатирует заметное обогащение сырной массы палочковидными формами, которые, все возрастая в числе, к трехмесячному возрасту составляют уже около половины всех видимых под микроскопом клеток. Приблизительно такое же их развитие—по крайней мере по масштабу—отмечается и методом



предельных разведений, данные которого в этом отношении несомненно более адекватны, чем данные чашечного метода, заведомо не досчитывающего элементы этого рода. В результате всех сопоставлений я решаю притти к выводу, что и при исследовании сыра числовые данные, получаемые методом непосредственного подсчета, стоят гораздо ближе к реальным величинам, чем данные чашечного метода, что они менее условны, чем эти последние.

Во всех этих соотношениях остаются пока совершенно невыясненными роль и судьба вымирающих клеток,—а в столь длительном процессе они, конечно, рано или поздно должны выступать на сцену. Если допустить их существование, приняв в то же время общераспространенную гипотезу, что они неопределенно долгое время учитываются под микроскопом наравне с живыми клетками, следовало бы ожидать (при непосредственном подсчете) непрерывного возрастания числа учитываемых клеток. Другими словами, кривая изменений микрофлоры, начерченная по данным непосредственного подсчета, не только вся целиком должна идти вверх, но и не должна иметь нисходящих отрезков: в самом деле, ведь если даже размножение совершенно прекратилось, и все существовавшие ранее клетки вымерли, то за соответствующий период число учитываемых клеток не будет изменяться, и данный отрезок, кривой должен пойти горизонтально; во всех остальных случаях, т.-е. когда одновременно происходит и размножение и вымирание, число учитываемых под микроскопом клеток будет всегда возрастать, т.-е. кривая изменений будет подниматься. Такой именно формы кривой я ожидал в результате предпринятой мною работы. Однако в действительности получилось нечто совершенно иное: кривые изменений микрофлоры, как по моей работе, так и по дополнительной работе Г. Х. Ж а б о т и н с к о г о, обнаруживают такие же повышения и понижения, как и кривые, полученные в результате подсчета колоний на чашках, причем в общем наблюдается известный параллелизм в изгибах тех и других кривых. Этот неожиданный параллелизм может быть объяснен, мне кажется, только одним, наиболее вероятным предположением: приходится допустить, что клетки микроорганизмов вскоре же после своей смерти перестают быть видимыми под микроскопом,—потому ли, что они теряют способность окрашиваться, или потому, что они совершенно исчезают, растворяются в окружающей среде. Что исчезновение клеток из поля зрения микроскопа в известных случаях действительно происходит и притом с катастрофической быстротой—подтверждается наблюдениями, как моими собственными, так и студентов Е. Коноплевой и К. П. Смирновой в их дипломных работах, исследовавших развитие молочнокислых бактерий в разных сортах молока. Именно, в ходе этих работ неоднократно наблюдались случаи, правда, не

эти случаи были связаны с резкой аномалией патологического характера в развитии культур,—когда в течение каких-нибудь 1—2 часов число видимых под микроскопом клеток (на 1 см<sup>3</sup>) падало с 1—2 миллиардов до сотен и даже десятков тысяч. При этом подсчет контрольных посевов в чашках с мясо-пептонным агаром давал такой же скачок, указывавший на действительное вымирание клеток. Все эти наблюдения требуют, конечно, дальнейшей проверки на более обширном и разнообразном материале, но и на основании имеющихся данных приходится, очевидно, коренным образом изменить наше представление о значении цифр, получаемых в результате непосредственного подсчета: во всяком случае мы не имеем никаких оснований принимать, что эти цифры представляют собою просто сумму чисел живых и вымерших за весь предшествовавший период клеток; если в некоторых случаях и за короткий период наблюдения наличность последних и может несколько изменить результат, то во всяком случае, как правило—по крайней мере по отношению к сыру, присутствие вымерших клеток вероятно менее искажает картину процесса, как она рисуется в результате подсчетов, чем неполное прораствание заведомо живых клеток на чашках (частью благодаря присутствию скоплений, частью благодаря неспособности многих клеток расти на данной среде).

После этих соображений общего характера, относящихся в одинаковой степени как к моей предварительной работе, так и к работе Г. Х. Жаботинского, перейду к более подробному рассмотрению результатов этой последней. Сопоставляя данные непосредственного подсчета и подсчета колоний в чашках в последовательные моменты процесса варки и созревания сыра, автор отмечает, что степень расхождения между двумя указанными рядами цифр все время изменяется, при чем в этих изменениях наблюдается как-будто некоторая закономерность. Это видно из следующей сводной таблички:

Таблица V

НАЗВАНИЕ И МОМЕНТ ВЗЯТИЯ ПРОБЫ	1-я варка		2-я варка		3-я варка	
	Чашечный подсчет в %	Непосред- ственный подсчет в %	Чашечный подсчет в %	Непосред- ственный подсчет в %	Чашечный подсчет в %	Непосред- ственный подсчет в %
Молоко . . . . .	100	158	100	241	100	186
Зерно . . . . .	»	148	»	154	»	129
Сыр через 2 суток . . . . .	»	284	»	273	»	379
» » 7 » . . . . .	»	227	»	313	»	400
» » 10 » . . . . .	»	220	»	245	»	352
» » 15 » . . . . .	»	366	»	340	»	330
» » 25 » . . . . .	»	441	»	440	»	490

Как видим, в ранних стадиях процесса—в молоке, зерне и молодом сыре—степень расхождения между данными обоих методов сравнительно невелика; затем идет увеличение, особенно заметное к концу данного периода. Изменение степени расхождения объясняется повидимому изменением размеров предельных комочков суспензии, получаемой при растирании массы, в зависимости от изменения консистенции этой последней (единицей счета в данной работе при непосредственном подсчете была каждая отдельная клетка, а при подсчете в чашках, как обычно,—каждый отдельный комочек, независимо от числа клеток, которые в нем содержатся). Интересно отметить, что почти во всех без исключения случаях,—и это относится не только к работе Г. Х. Жаботинского, но и ко всем вообще исследованиям голландского сыра, произведенным в нашей лаборатории,—в сыре, имеющем возраст 20—24 часа, чашечный подсчет, а также нередко и подсчет по методу предельных разведений, отмечает некоторое снижение числа бактерий, в то время как кривая непосредственного подсчета этого снижения не обнаруживает. Так как никаких видимых причин фактического вымирания микробов в указанный момент не имеется (сыр в это время не подвергается никаким резким воздействиям, и соль с поверхности еще не успела проникнуть до середины, откуда берется проба), то, пожалуй, единственным вероятным объяснением этой отмечаемой анализами депрессии может быть лишь предположение, что в это время сама сырная масса приходит в такое состояние, в котором она трудно поддается растиранию; это влечет за собою увеличение средней величины комочков и тем самым понижение числа учитываемых клеток, хотя фактически в это время, вероятно, происходит еще размножение их. Так что и в этом случае непосредственный подсчет дает, вероятно, цифры, более близкие к реальным величинам. С другой стороны, по отношению к развитию палочковидных форм,—главным образом, вероятно, типа *Bact. casei*,—которые несомненно чашечным методом учитываются далеко не полно, кривые, полученные непосредственным подсчетом и по методу предельных разведений, обнаруживают довольно отчетливый параллелизм (обоими методами начало заметного развития этих форм отмечается на 15-й—20-й день созревания сыра, и в дальнейшем масштаб изменений в обоих случаях почти один и тот же). По отношению же к так называемому «общему» числу бактерий, измеряемому числом колоний, выросших на чашках Петри, более отчетливый параллелизм наблюдается между данными чашечного метода с одной стороны и непосредственного подсчета—с другой (об этом уже говорилось выше); кривые, полученные по методу пределов, хотя по масштабу и сближаются с кривыми непосредственного подсчета, однако параллелизм в изгибах этих кривых трудно подметить, благодаря слишком резким скачкам, которые дает всегда

метод пределов, очевидно, в силу своей слишком большой зависимости от степени измельчения исследуемого материала. Вероятно в связи с этим находится одна любопытная особенность в ходе кривых, получаемых по методу пределов почти во всех работах с сыром: именно почти всегда эти кривые дают наиболее резкие случайные скачки в первые дни процесса созревания, когда растворимость сырной массы минимальная, что вызывает, конечно, наибольшие колебания в степени измельчения.

Что касается условной точности метода, определяемой величиной отклонений отдельных, частных результатов от средней величины, то она характеризуется следующими сравнительными цифрами (в процентах от средней величины):

Таблица VI

№ ВАРКИ	Наименьшая величина отклонений		Наибольшая величина отклонений		Средняя величина отклонений	
	Непоср. подсчет	Подсчет в чашках	Непоср. подсчет	Подсчет в чашках	Непоср. подсчет	Подсчет в чашках
1	0,00	0,00	36,00	53,18	7,85	12,70
2	0,41	0,00	57,00	106,00	12,81	24,15
3	0,46	0,00	30,00	105,00	10,03	22,24
В среднем	0,30	0,00	41,00	87,73	10,23	19,68

Как видим, по отношению к сыру и при том способе счета, который был принят в данном случае (учет каждой отдельной клетки), точность метода непосредственного подсчета—в вышеуказанном смысле—в противоположность тому, что констатировала Е. Н. Измайлова по отношению к молоку, оказалась значительно выше, чем точность чашечного метода.

После всего сказанного едва ли могут остаться какие-либо сомнения в целесообразности нового метода в области исследования микрофлоры созревающих сыров. Именно здесь он открывает чрезвычайно широкие перспективы, позволяя в короткое время и с большой детализацией пересмотреть такую массу материала, которая при пользовании чашечным методом потребовала бы не одного года работы. В качестве иллюстрации сокращения времени, которое дает новый метод по отношению к сыру, достаточно сказать, что, работая урывками, между делом, я один успевал провести по этому методу то же число анализов, которое, при большом напряжении труда, в тот

же период времени выполняли три опытных работника нашей лаборатории, пользуясь методом посевов.

Вторая часть работы Г. Х. Жаботинского была посвящена более детальной разработке техники нового метода применительно исследованию сыра.

Эта задача естественно распадалась на следующие отдельные части:

1. Предварительная подготовка материала к приготовлению из него препарата:

а) Консервирование проб, в целях неопределенно долгого хранения их без изменения начального числа окрашивающихся клеток.

б) Обезжиривание сырной массы.

в) Применение тех или иных растворителей при переводе сырной массы в эмульсию, в целях достижения более однородной консистенции последней.

2. Способ окрашивания препарата, как общего, так и дифференциального,—для выделения при учете тех или иных специфических элементов (например, палочковидных форм).

В порядке перечисленных пунктов я и буду вести изложение результатов работы Г. Х. Жаботинского.

1. а) хотя консервирование проб и не является безусловно необходимым условием применения метода,—выполнение анализов тотчас после взятия проб не представляет, вообще говоря, никаких принципиальных затруднений,—однако разделение во времени операций взятия пробы и выполнения анализов во многих случаях (особенно, когда место взятия проб территориально удалено от лаборатории, выполняющей анализы) может чрезвычайно облегчить организацию работы, иногда сделать ее в несколько раз продуктивнее; а это разделение ведь возможно лишь при условии вполне надежного консервирования проб. Поэтому вопросу о консервировании нами было уделено довольно много внимания.

В своей предварительной работе я считал возможным соединить операции консервирования и обезжиривания, обрабатывая материал сначала спиртом (для обезвоживания), а затем эфиром; но я не имел времени проверить действительность этих операций в смысле консервирования; эта проверка, а также и испытание для той же цели некоторых других реактивов были выполнены Г. Х. Жаботинским. Операция консервирования проб в данном случае должна отвечать следующим двум требованиям: 1) она должна в полной мере гарантировать прекращение в данном материале размножения клеток, находящихся в нем в момент взятия пробы,— для этой цели может быть пригоден любой антисептик, хотя бы и не особенно активный, в роде, например, спирта, на действие которого я в своей работе и рассчитывал (сохранение в материале некоторых клеток в живом состоянии не имеет никакого значения,

если только они поставлены в условия, исключаяющие размножение); 2) сохранение всех клеток в таком состоянии, чтобы они не теряли способности к окрашиванию. Сообразно этому второму требованию и следовало произвести подбор наиболее пригодных антисептиков.

Для проверки пригодности антисептиков по отношению к первому требованию Г. Х. Жаботинским был поставлен следующий небольшой опыт. Навески сыра в один грамм с микрофлорой в пределах нескольких миллиардов выдерживались двое суток в различных антисептиках, и затем из этих навесок (после удаления остатка антисептика промыванием в стерильной воде) обычным способом приготавливались посевы в чашках Петри. Результаты этого опыта выражаются следующими цифрами:

Проба сыра, консерв. в 48% спирте	содержала в 1 л	1200 живых клеток
» » » » 96% » » » 1 »	750 » »	
» » » » 5% феноле » » 1 »	750 » »	
» » » » 0,25% сулемы » » 1 »	40 » »	
» » » » 1% формалина » » 1 »	120 » »	

Как и следовало ожидать, наиболее активными оказались сулема и формалин, фенол и спирт значительно слабее; однако, применительно к данному случаю, и два последних антисептика можно признать достаточно сильными: размножение-то клеток они во всяком случае остановят,—а этого в данном случае вполне достаточно. Таким образом в этом отношении все испытанные антисептики можно считать вполне равноценными.

Однако, по отношению ко второму требованию (неизменяемость клеток по отношению к окрашиванию), как оказалось, эти антисептики далеко не равноценны. Именно в результате целого ряда опытов, поставленных Г. Х. Жаботинским, выяснилось: 1) при кратковременном выдерживании проб сыра в вышеуказанных антисептиках, до 7—10 дней, ни один из них не вызывает заметного понижения числа окрашивающихся клеток, однако общая яркость окрашивания при этом несколько понижается при употреблении спирта и фенола, чего не наблюдается после выдержки в формалине и сулеме; 2) при более долговременной выдержке в указанных антисептиках спирт и фенол могут в довольно сильной степени понижать число окрашивающихся клеток, в то время как формалин и сулема оставляют это число почти без изменения; 3) наилучшие результаты (в отношении яркости окрашивания клеток) получаются, если проба выдерживается в двух последних антисептиках в течение двух суток, после чего высушивается на фильтровальной бумаге и в дальнейшем хранится в сухом состоянии (повидимому, неопределенно долгое время). В этом случае довольно хорошие

результаты дают также спирт и фенол. На основании этих опытов наиболее пригодными антисептиками следует признать, таким образом, сулему (в концентрации 0,025%) и формалин (1% раствор продажного препарата). Сулема имеет еще и ту выгодную сторону, что сырная масса в ней чрезвычайно размягчается, вследствие чего дает весьма тонкую эмульсию. Формалин оказывает обратное действие, поэтому, в случае употребления этого антисептика, обыкновенно приходится прибегать (при последующем растирании пробы) к добавлению растворителей— например, 1—1,5% аммиака, о чем подробнее будет сказано ниже.

1. б) Обезжиривание пробы. Эта подготовительная операция, как показали опыты, вообще говоря, не является безусловно необходимой. Больше всего присутствие жира мешает при растирании (жир сбивается в комочки), однако это неудобство довольно легко устраняется при употреблении в этой операции нагретой (градусов до 50) воды; на чистоту препарата присутствие жира влияет довольно слабо, и лишь в тех случаях, когда используется метод негативной окраски (нигрозином, тушью и т. п.), обезжиривание является почти необходимым. Вполне достаточное обезжиривание достигается выдерживанием пробы (навески) в течение 2—3 часов в спирте, а затем столько же времени в эфире или хлороформе; если материал хранится до анализа в спирте (не более 10 дней) или— после обработки антисептиком— в высушенном состоянии, то обработка спиртом естественно отпадает, так как последний необходим лишь для удаления воды перед обработкой эфиром или хлороформом.

1. в) Применение растворителей при растирании пробы. Эта деталь также не является безусловно необходимой, за исключением разве лишь случая предварительной обработки сырной массы формалином (в целях консервирования). Однако самая процедура растирания и эмульгирования чрезвычайно облегчается и ускоряется прибавлением растворителей, а потому в большинстве случаев это прибавление следует признать весьма желательным. Поставленные в этом направлении опыты Г. Х. Жаботинского показали, что не все растворители пригодны для этой цели, так как некоторые из них вредно отражаются на способности клеток к окрашиванию. Сильнее всего действует таким образом едкий натр, который вследствие этого приходится признать совершенно непригодным. Аммиак (в концентрации 1,5 - 2% обычного продажного) в большинстве случаев дает удовлетворительные результаты; но наиболее нейтральным в этом отношении является 5% раствор салицилово-кислого натрия, почти не затрагивающий способности клеток к окрашиванию. Растворитель рекомендуется прибавлять в небольшом количестве (1—2 см<sup>3</sup>) при самом начале растирания в ступку; дальнейшее разведение массы до нужных пределов (чаще всего наиболее

подходящим является разведение до 40 объемов) производится водою (можно нестерильной, но, как сказано выше, лучше слегка нагретой). Выше было указано, что в случае предварительной обработки сырной массы сулемой прибавление растворителя оказывается излишним, так как сулема сама по себе достаточно разрыхляет массу; напротив, после обработки формалином прибавление растворителя почти необходимо.

2. Окрашивание препарата в тех случаях, когда клетки не утратили в той или иной степени способности к окрашиванию, достигается вообще довольно удовлетворительно обычными приемами (выдержка в метиленовой синьке 1—2 минуты с легким подогреванием). Восстановить какими-либо приемами обработки ослабленную способность к окрашиванию, повидимому, невозможно. Применение в подобных случаях каких-либо других, более сильно действующих красок—например, фуксина, метиль-виолет и т. п.,—уже потому не может дать хороших результатов, что подобные краски слишком интенсивно окрашивают частички белка, затрудняя таким образом отличие бактериальных клеток от всяких других частиц. Различные способы «негативной» окраски (тушью, нигрозином и т. п.), которые во многих случаях дают весьма отчетливый препарат, в применении к сыру едва ли могут быть использованы, как общий прием исследования, так как, в виду большей распространенности в сыре коккообразных клеток, легко смешиваемых с жировыми шариками, эти способы могли бы давать хорошие результаты лишь при условии достаточно полного обезжиривания, что довольно трудно достигается. Однако для некоторых специальных целей, именно для палочковидных клеток, подобные способы и здесь оказываются весьма целесообразными, особенно если принять во внимание, что именно среди этих элементов, составляющих нередко основной фон микрофлоры во второй половине процесса созревания сыра, очень нередки формы, трудно поддающиеся окрашиванию метиленовой синькой (сюда относятся как некоторые виды типа *Bact. casei*, так в особенности, по моим наблюдениям, некоторые формы *Bact. propionicum*). Так как правильный учет этого рода элементов представляет одну из важнейших задач исследования сыра, — кстати сказать, весьма несовершенной разрешаемую чашечным методом, — методике их учета в работе Г. Х. Жаботинского уделено особое внимание. Во всех трех исследованных им варках сыра, во второй половине процесса, когда можно ожидать появления этих элементов, им были проведены параллельные подсчеты при обоих способах окрашивания препаратов (метиленовой синькой и нигрозином). Результаты этих подсчетов сведены в следующей таблице:



Таблица VII

	Препарат, окраш. мети- лен. синькой	Препарат, окраш. нигрозином
<b>1-я варка</b>		
Сыр 15 сут. . . . .	260 000 000	1 152 000 000
» 20 » . . . . .	800 000 000	1 240 000 000
» 25 » . . . . .	600 000 000	2 800 000 000
» 30 » . . . . .	300 000 000	1 600 000 000
<b>2-я варка</b>		
Сыр 25 сут. . . . .	490 000 000	572 000 000
» 30 » . . . . .	576 000 000	920 000 000
<b>3-я варка</b>		
Сыр 15 сут. . . . .	263 000 000	1 100 000 000
» 20 » . . . . .	330 000 000	1 100 000 000
» 25 » . . . . .	200 000 000	1 600 000 000
» 30 » . . . . .	170 000 000	1 700 000 000

Из этих сравнительных данных ясно видно, что препарат, окрашенный нигрозином, позволяет учесть гораздо большее число палочковидных клеток, чем это можно сделать в препарате, окрашенном метиленовой синькой, при чем это расхождение цифр все более и более увеличивается к концу процесса. Последнее обстоятельство, как можно думать, объясняется тем, что к концу процесса повышается число клеток, не окрашивающихся метиленовой синькой. Расхождение цифр во всяком случае очень значительно, и так как ошибка здесь, очевидно, на стороне обычного метода окраски, то поправку, вносимую окраской нигрозином, следует признать весьма существенной.<sup>1</sup>

Само собою разумеется, что в дальнейшем могут быть найдены какие-нибудь другие, более тонкие приемы проявления слабо окрашивающихся клеток, но пока, повидимому, лучшим средством для этого следует признать окраску нигрозином или хорошей (заграничной) тушью. Этим способом, во всяком случае, мы можем рассчитывать на проявление всех клеток, хотя и потерявших способность к окрашиванию, но сохранивших свою материальную структуру и форму.

<sup>1</sup> Вопрос о том, в какой мере указанное расхождение данных, полученных при двух методах окраски—метиленовой синькой и нигрозином,—является результатом накопления в субстрате мертвых клеток, остается пока невыясненным. Быть может, не исключена возможность именно в этих различиях по отношению к окраске найти реактив для различения мертвых и живых элементов.

Как результат второй части работы Г. Х. Жаботинского, мы можем принять, таким образом, следующую общую рецептуру для применения нового метода к исследованию микрофлоры сыра:

### 1. Подготовительные операции.

а) Если сыр подвергается исследованию не позднее 7—10 дней после взятия пробы, то последняя, в виде навески в 1 г (с точностью до 10 мг, без соблюдения стерильности посуды и проч.), вносится в пробирку с 3—5 см<sup>3</sup> спирта (можно пользоваться денатуратом), в котором и выдерживается до анализа. За несколько часов до последнего спирт сливается и заменяется таким же количеством эфира или хлороформа. Незадолго до начала растирания жидкость сливается с кусочка сырной массы, и последняя переносится в небольшую стеклянную ступочку, где оставляется на некоторое время открытой для испарения остатков эфира или хлороформа.

Для приготовления эмульсии отмеривается 40 см<sup>3</sup> воды и вливается в небольшую колбочку, где подогревается градусов до 50 С. Из этой колбочки 2—3 см<sup>3</sup> воды вносится в ступку с пробой сыра, и с этим количеством воды производится главное растирание. Когда масса приобретет равномерную сметанообразную консистенцию, к ней прибавляется еще небольшое количество воды из колбочки, и полученная после смешения жидкость сливается осторожно в ту же колбочку; если в ступке после этого остаются заметные комочки, то они снова растираются и опять смываются в колбу небольшим количеством воды, взятой из этой последней. Эту операцию можно повторить раза два (особенно большая точность не требуется). Для ускорения растирания и получения более однородной эмульсии можно вместо первой порции воды прибавить в ступку такое же количество 5% раствора салицилово-кислого натра (на это количество следует, конечно, уменьшить количество воды, отмеренное в колбе). В остальном операции располагаются так, как сказано выше.

б) Если анализ предполагается отделить от момента взятия пробы на срок более 10 дней, то навеска пробы сыра консервируется в пробирке с 3—5 см<sup>3</sup> 0,025% сулемы или 1% формалина, причем лучше по прошествии 2—3 суток антисептик удалять, а пробу высушивать на фильтровальной бумаге. В таком виде проба может храниться неопределенно долгое время в сухой пробирке или даже просто в бумаге. Впрочем высушивание пробы после консервирования не представляется необходимым.

Дальнейшая обработка консервированных проб производится так, как сказано в пункте а), за исключением лишь обработки спиртом, которая по отношению к высушенным пробам становится излишней. Кроме того, как сказано выше, в случае

употребления в качестве антисептика формалина, необходимо при растирании прибавление растворителя (в данном случае хорошие результаты дает не только салицилово-кислый натр, но и 1,5—2% аммиака).

## 2. Приготовление и окраска препарата-мазка.

Тотчас после приготовления эмульсии последняя тщательно встряхивается и сейчас же, по возможности быстро, из нее готовится обычным образом смесь с титрованной суспензией. Эта смесь может в свою очередь сохраняться довольно долго, во всяком случае несколько дней, до приготовления из нее препарата (только само собою разумеется, что каждый раз непосредственно перед приготовлением последнего смесь необходимо тщательно встряхивать).

а) Приготовление и окрашивание мазка для общего учета клеток выполняется обычным способом (эмульсия намазывается на холодное стекло, фиксируется на пламени, и на неостывшее еще стекло наливается несколько капель метиленовой синьки, которая затем почти тотчас сливается, и препарат промывается водою).

б) В тех случаях, когда в сыре можно предполагать присутствие сколько-нибудь заметного количества дрожжеподобных микроорганизмов, обычным образом фиксированный мазок, перед окрашиванием метиленовой синькой, обрабатывается, как выше описано, люголевским раствором и спиртом, в результате чего дрожжеподобные клетки, присущие самому сыру, дифференцируются от клеток титрованной суспензии.

в) Окраска нигрозином для специального учета палочковидных форм осуществляется следующим образом: на предметное стекло наносится петлей одна капля обычной смеси с титрованной суспензией и затем на то же место стекла — одна капля насыщенного водного раствора нигрозина; обе жидкости тщательно смешиваются петлей и размазываются на площади желательной величины. Полученный мазок высушивается на холоду и без фиксации рассматривается с иммерсионной системой (кедровое масло наносится непосредственно на мазок).

## 3. Применение непосредственного подсчета к исследованию других материалов и процессов.

Кроме двух указанных направлений работы (исследование свежего молока и разного возраста сыра), в которых применение нового метода было изучено более подробно, в нашей лаборатории он неоднократно испытывался и в других областях исследования и почти всегда с довольно хорошими результатами; имевшие иногда место случайные неудачи всегда объяснялись недостаточной разработанностью методики применительно к отдельным специальным случаям.

а) По отношению к исследованию масла применимость нового метода была установлена аспирантом ВМХИ Р. А. Шуниной в ее работах с плесенью в масле, причем она остановилась на следующих приемах методики: взятая проба масла плавится при темп. около  $50^{\circ}\text{C}$  в пробирке,  $1\text{ см}^3$  ее берется для приготовления смеси с титрованной суспензией, последняя снова подогревается до указанной температуры и взбалтывается до образования вполне равномерной эмульсии, из которой тотчас готовится обычным способом мазок. После высушивания мазок фиксируется на пламени, обезжиривается—смыванием несколькими каплями хлороформа (из пипетки) или путем осторожного прикладывания фильтровальной бумаги—и, наконец, окрашивается, в зависимости от задачи исследования, или просто метиленовой синькой, или с предварительной обработкой люголевским раствором (как сказано выше). Этот способ позволяет учитывать в препарате не только клетки бактерий, но и клетки дрожжей, а также и плесеней (и их споры).

б) К учету микрофлоры с вернувшегося молока непосредственный подсчет неоднократно применялся как мною самим, так и студентами, выполнявшими дипломные работы. Никаких существенных изменений в методике по сравнению с исследованием свежего молока при этом не требуется. Лишь в некоторых случаях, когда сгусток имеет слишком плотную консистенцию и не поддается при приготовлении смеси достаточно полному измельчению, целесообразно прибавлять в смесь 1--2 капли аммиака или, еще лучше,  $5\%$  раствора салицилово-кислого натра. Соотношения результатов двух методов здесь подробно не прослежены.

#### **IV. Значение и место метода непосредственного подсчета в общем плане аналитической работы**

В настоящей статье, выдвигая и пропагандируя свой новый метод, как широкий прием микробиологического исследования, я имею в виду не столько ту частную форму, которую я ему придал,—хотя она и представляется мне, по крайней мере в молочном деле, весьма целесообразной,—сколько общую идею непосредственного подсчета микроорганизмов путем микроскопического наблюдения. Эта идея, можно сказать, носится в воздухе, потребность в ее осуществлении несомненно чувствуется многими исследователями. По этому поводу мне часто вспоминаются горячие призывы одного из талантливейших русских микробиологов—покойного профессора Н. Н. Худякова—призывы, обращенные им к молодым работникам-ученикам: «Вернуться от культур к забытому, заброшенному микроскопу». Эта фраза, может показаться, пожалуй, одним из блестящих парадоксов, которые так любил покойный профессор. В самом деле, ведь ни один серьезный микробиолог

в своем увлечении культурами никогда не доходил до отрицания микроскопа, как одного из основных инструментов исследования; а с другой стороны сам автор приведенной фразы, конечно, никогда не думал отрицать значение метода наблюдения живых культур. Но если это до некоторой степени и парадокс, то во всяком случае он с чрезвычайной меткостью и отчетливостью отмечает одно из наиболее уязвимых мест в современной методике микробиологического исследования: в ней действительно слишком мало места уделяется непосредственному микроскопическому наблюдению, которое заменяется наблюдением культур; и это особенно относится к операциям учета, в которых обычная методика совершенно отрывается от непосредственной реальности, открываемой нам только микроскопом. Вот эту-то несомненную ошибку в методологической перспективе, которую мы как-то привыкли не замечать, и напомнил Н. Н. Худяков в приведенной фразе. Конечно, мы еще далеки от исправления этой ошибки в целом, но некоторые шаги в этом направлении мы уже и теперь можем сделать. И моя настоящая статья является одной из попыток наметить путь к исправлению ошибки, хотя бы в ограниченной области учета микроорганизмов.

Я нарочно остановился на «парадоксе» Н. Н. Худякова, чтобы отклонить возможную ошибку в понимании моих собственных мыслей, относящихся к данному вопросу: я не хотел бы, чтобы основная мысль моей статьи была истолкована так, как будто я, доказывая целесообразность нового метода, рекомендую заменить им чашечный метод, совершенно отказавшись от последнего. Такой мысли у меня, конечно, не было. Я, напротив, совершенно убежден, что оба метода должны быть сохранены, потому что каждый из них открывает нам лишь некоторую часть искомой нами реальности, нередко дополняя друг друга. Для наибольшего приближения к этой реальности мы должны не заменять один метод другим, а найти наиболее целесообразное методологическое соотношение между ними. Выяснению этих соотношений я и хочу посвятить этот последний, заключительный отдел своей статьи.

Чтобы отчетливее представить себе роль и место каждого из двух методов в общем плане микробиологического исследования, нужно припомнить принципиальную, внутреннюю сущность и смысл тех ответов—независимо от степени их точности, которые они дают на поставленные нами вопросы. По своему смыслу эти ответы, как мы видели, существенно различны. Методы, связанные с культивированием живых микробов,—будет ли это культивирование иметь форму посева в чашки Петри или в трубочки Бурри (в аэробных или анаэробных условиях) или, наконец, посева в ту или иную жидкую среду соответственных предельных разведений исследуемой массы,—все эти методы стремятся учесть живые клетки находящиеся

в субстрате микроорганизмов, но по самой сущности своей учитывают их не все, а лишь те, которые способны расти в данных питательных средах и при данных условиях. Однако в то же время этого рода методы, в результате размножения клеток, если оно имеет место, дают нам в руки массовые живые культуры интересующих нас микроорганизмов,—в виде ли чистых культур (при посеве на твердых средах), или в виде не вполне чистых, но во всяком случае господствующих культур (при посевах предельных разведений в те или иные специфические среды). Эта вторая задача подобных методов часто не менее важна, чем первая (задача общего учета живых клеток): ведь разрешение ее дает нам возможность не только вообще вести качественный анализ микрофлоры, учитывая отдельно число клеток различных видов или групп, но и позволяет нам, в результате дальнейшего культивирования в искусственно поставленных условиях опыта, подробно исследовать физиологические особенности этих видов, химическое воздействие их на окружающую среду, а последнее во многих случаях составляет главнейшую задачу исследования. В виду этого в тех случаях, когда качественный состав исследуемой микрофлоры для нас небезразличен, и когда при этом природа ее элементов совершенно нам неизвестна даже в общих чертах,—в этих случаях методы, основанные на культивировании, должны быть первыми и основными орудиями работы.

В совершенно иной плоскости ставят и разрешают задачу анализа методы непосредственного подсчета, независимо от формы, какую они принимают. Принципиально они учитывают не только живые, но и все вообще видимые под микроскопом клетки микроорганизмов, независимо от того, растут ли они на тех или иных питательных средах или нет. Непосредственный подсчет, как видим, дает, вообще говоря, более полное решение задачи. Но... есть несколько «но», ограничивающих эту полноту. Во-первых, непосредственный подсчет не всегда позволяет нам учесть с уверенностью наиболее интересующую нас группу клеток—живых, активных клеток, непосредственно участвующих в тех или иных химико-биологических процессах: видимыми могут быть и неживые клетки, и нет признаков, позволяющих отличать живые клетки от мертвых. Правда, мы имеем основание думать, что тела умерших микроорганизмов не так долго сохраняют свою микроскопическую видимость, как это обычно предполагается. Но все же во многих случаях мы несомненно не можем ожидать совпадения между числом в и д и м ы х и ж и в ы х клеток. Правда и то, что мертвые клетки вовсе не представляют собою *quantité négligeable* с точки зрения биохимических процессов, протекающих в среде: ведь несомненно, что тела микроорганизмов

после своей смерти продолжают воздействовать на окружающую среду, выделяя в нее образовавшиеся при жизни энзимы (имеется, например, указание, что выделение протеолитических энзимов клетками молочно кислых бактерий происходит особенно энергично именно после смерти последних). Поэтому для оценки химической активности данной массы микробов учет мертвых клеток во многих случаях, быть может, имеет не менее существенное значение, чем учет живых. Однако все же нельзя забывать, что ход самого микробиологического процесса характеризуется ведь изменением числа живых и мертвых клеток (отчасти соотношением между живыми и мертвыми), и потому приходится признать, что невозможность методами непосредственного подсчета учитывать отдельно живые и мертвые клетки значительно ограничивает полноту даваемого ими решения.

Во-вторых, — это особенно важно, — непосредственный подсчет под микроскопом, вообще говоря, не дает нам возможности качественно оценивать те или иные группы видимых элементов, по крайней мере со стороны физиологических особенностей. Мы различаем, правда, под микроскопом те или иные типы клеток по форме, величине, характеру группировок, мелким структурным особенностям, но ведь далеко не всегда на основании одних только этих чисто морфологических признаков удастся установить принадлежность клеток к тем или иным видам с определенной физиологической характеристикой, — а ведь это во многих случаях составляет одну из главных задач анализа. Если во многих случаях, при известном навыке, мы и можем по внешним признакам клеток угадывать в общих чертах физиологический тип клеток, то во всяком случае в процессе микроскопического наблюдения и подсчета микрофлора лишь мимоходом пробегает через наши поля зрения, и мы лишены возможности зафиксировать в своих руках отдельные ее элементы для сколько-нибудь подробного изучения их физиологических особенностей. В этом смысле анализ, произведенный путем микроскопического наблюдения, всегда будет более поверхностным, чем анализ, выполненный методами культивирования, — и уже по одной этой причине не всегда целесообразной является замена второго типа методики первым.

Таким образом, мы видим, что ни один из рассматриваемых методологических принципов не может претендовать (независимо от степени точности выполнения) на полное разрешение всех существенных задач микробиологического анализа, — у каждого из них имеются те или иные слабые места, ограничивающие его эффективность. Вот почему не имело бы никакого смысла спорить о том, какой из принципов вообще должен занять первое место в микробиологической методике, — каждый из них наиболее целесообразно используется для разрешения тех задач анализа, к которым он более приспособлен; наиболее же полный

результат мы можем получить, комбинируя по известному плану,—в порядке ли параллелизма, или в порядке последовательности,—оба методологических принципа. Рассмотрением главнейших типов такого планирования я и закончу свою статью.

1. Направления работы, в которых незаменимым является принцип культивирования (в частности чашечный метод).

Во всех тех случаях, когда нашей задачей является исследование микрофлоры (или микробиологических процессов) с качественной стороны, при чем эта качественная сторона нам почти неизвестна, — основным и первоочередным орудием анализа могут быть лишь методы культивирования; непосредственный подсчет в подобных случаях может быть лишь подсобным методом. Так, например, если бы мы не имели никакого представления о том, какие качественно различные элементы микрофлоры участвуют, сменяясь, в процессе созревания сыра,—начинать исследование этой микрофлоры с непосредственного подсчета не имело бы никакого смысла. Этот путь мог бы вскрыть нам лишь интенсивность процесса в разные его моменты, но не дал бы нам никаких указаний о той роли, какую играют в нем микроорганизмы. Лишь методы культивирования в данном случае могут вскрыть нам эту роль. Точно так же, если бы мы ничего не знали о характере тех изменений, которые происходят в молоке под влиянием размножающихся в нем бактерий, и если бы при этом нашей задачей было выяснение роли последних в этих изменениях, то непосредственный подсчет под микроскопом, будучи примененным самостоятельно, без комбинирования с другими методами, оказался бы почти бесплодным: он показал бы нам только интенсивность развития бактерий в разные моменты существования молока, но качественная сторона процесса осталась бы совершенно невыясненной. Одним словом, как правило, можно принять общее положение, что во всех случаях, когда задачей качественно-количественного анализа являются изыскания в совершенно еще неисследованной в этом отношении области микрофлоры, методы культивирования, при всем их несовершенстве, остаются пока единственным и незаменимым орудием исследования.

2. Задачи, при разрешении которых целесообразным является комбинирование обоих методологических принципов.

Представим себе теперь (возвращаясь к приведенному примеру), что микробиологическая сущность процесса созревания сыра в общих чертах уже выяснена (с помощью методов культивирования); что нам уже приблизительно известна роль



морфологически различных элементов в этом процессе (приблизительно в таком состоянии находятся наши знания о сыре в данный момент),—при этих условиях метод непосредственного подсчета может быть использован, как чрезвычайно продуктивное орудие дальнейшего исследования. С его помощью мы можем с большей полнотой углубить наше представление о микробиологической динамике процесса, учтя изменения различных микробиологических факторов, участвующих в его развитии. В результате мы получим картину процесса и более детализированную, и более адекватную действительности, чем это мог бы дать какой-либо из методов культивирования.

Этот пример приводит нас к группе случаев, когда наибольший эффект достигается комбинированием, сочетанием двух методологических принципов, причем чаще всего, как в данном случае, целесообразным является планирование работы в порядке последовательного применения двух типов методики: сначала, для общей ориентировки,—метод (или методы) культивирования, а затем, для детальной разработки,—непосредственный подсчет. Этот тип планирования может быть принят, как общий, во всех сложных, комбинированных работах, преследующих задачу детального качественно-количественного анализа процессов, протекающих при участии микроорганизмов: именно эта комбинация, как мне кажется, может дать наибольший эффект с наименьшей затратой труда и времени.

Во многих случаях однако и параллельное, одновременное применение обоих методов может быть весьма целесообразным. Это именно в тех случаях качественно-количественного исследования, когда мы имеем основание предполагать заведомое преуменьшение цифр при учете чашечным методом,—преуменьшение, заведомо искажающее картину процесса. В подобных случаях некоторым коррективом может служить только применение наряду с чашечным методом и метода непосредственного подсчета. Последний если и не даст нам в руки (в виде культур) недосчитанные в чашках элементы, то во всяком случае он учтет общее число наличных клеток и по числовой разнице позволит судить о масштабе ошибки. А между тем этот масштаб нередко может иметь решающее значение в окончательном выводе о роли тех или иных микробиологических элементов в ходе процесса. Представим себе, например, что по чашечному способу мы оценим какой-нибудь микробиологический элемент в 90% от всей микрофлоры (учтенной по тому же способу). В таком случае мы, конечно, вправе будем признать его руководящей формой, ведущей основную линию процесса, а все остальные элементы признаем случайными, не имеющими существенного значения; однако это будет справедливо лишь в том случае, если мы имеем основание предполагать хотя бы приблизительную адекватность учтенного общего числа микробов действительному их числу. И если это общее

число, найденное параллельно проведенным непосредственным подсчетом, приблизительно совпадет с числом, полученным чашечным методом, это будет служить вполне достаточным подтверждением нашего вывода. Напротив, если непосредственный подсчет приведет нас к общему числу клеток вдвое или втрое большему, чем дает чашечный способ, то, очевидно, этим самым выведенная нами цифра 90% для интересующего нас микробиологического элемента должна будет упасть до 45 или 30%, что, разумеется, заставит нас отказаться от своего первоначального вывода или во всяком случае поставить его под сомнение: данный элемент уже не может тогда считаться господствующим. Само собою разумеется, что приведенный ход рассуждений будет правильным лишь в том случае, если мы не имеем основания предполагать заметного участия в учете мертвых клеток; в противном случае расхождение между результатами двух методов может быть приписано именно этому участию.

Я не беру на себя задачи предусмотреть здесь все возможные случаи подобных комбинаций; но я полагаю, что и приведенные примеры достаточно доказывают возможность их плодотворного использования.

3. Задачи, в разрешении которых непосредственный подсчет является вполне достаточным и предпочтительным методом.

Особенно широкое—и притом вполне самостоятельное—применение должен найти непосредственный подсчет в тех случаях, когда качественный микробиологический анализ не входит в нашу задачу, когда последняя состоит лишь в количественном учете всех наличных элементов. С подобной постановкой задачи мы встречаемся: 1) когда мы имеем дело с заведомо чистыми культурами, ход развития которых в тех или иных определенных условиях мы хотим проследить, и 2) когда нас интересует вообще интенсивность микробиологических процессов в данном субстрате, независимо от качественного состава находящейся в нем микрофлоры. Первый случай имеет место во всех детальнейших исследованиях физиологического характера, выясняющих ход развития определенных микроорганизмов в различных питательных средах при тех или иных условиях. Это довольно обычный тип лабораторных исследований, способный дать весьма богатый материал для разрешения весьма тонких вопросов физиологии микроорганизмов, в том числе и практически важных для нас в известных областях техники. К сожалению, широкая постановка таких работ до сего времени сильно ограничивалась чрезвычайной громоздкостью их при пользовании общепринятым чашечным методом. Только непосредственный подсчет в той форме, какую я здесь предлагаю, как метод чрезвычайно простой и быстро дающий

результаты, может позволить нам довести этого рода работы до желаемой широты и детализации.

Второй случай представляют обычные контрольные исследования молока, а отчасти, может быть, и других продуктов (например, масла). В других областях—помимо молочного дела—этот метод может, повидимому, найти себе применение в подсчете кровяных телец, в подсчете дрожжевых клеток в различных бродящих жидкостях, наконец, в учете элементов почвенной микрофлоры, где аналогичный метод (в модификации, близкой к вышеописанной Бридовской), как известно, в недавнее время предложен Виноградским, и это предложение соответственными кругами исследователей встречено весьма сочувственно (следует впрочем заметить, что Виноградский считает возможным использовать этот метод не только для общего количественного, но и для качественного анализа микрофлоры почвы, что, как мне кажется, может встретиться и некоторые затруднения). Вопрос о применимости метода к контрольным анализам молока был подробно изложен мною выше, и здесь я ограничусь лишь упоминанием этой области применения.

В обоих указанных типах работы непосредственный подсчет, кроме отсутствия качественных определений, особенно облегчается в тех случаях, когда мы имеем основание предполагать, что мертвые клетки в исследуемом субстрате почти отсутствуют: таковы, например, случаи исследования молодых, развивающихся культур и сравнительно свежего, сырого молока. В подобных случаях мы имеем все основания принимать, что результат микроскопического подсчета, в пределах допускаемой им точности, вполне совпадает с действительным числом живых клеток, и потому в этих случаях наш метод во всех отношениях может заменить собою метод чашечного подсчета.

Наконец, есть еще одно обстоятельство, которое делает микроскопический подсчет особенно целесообразным при изучении развития живых культур,—это именно то, что здесь одновременно с учетом, так сказать, попутно, мы имеем возможность вести наблюдения над изменением величины, формы и структуры клеток в процессе смены их генераций и таким образом можем получить дополнительный весьма ценный материал, которого чашечный метод нам никогда бы не дал. В этом отношении приведенный выше призыв Н. Н. Худякова—«вернуться к микроскопу» следует признать особенно уместным.

## **V. Резюме. Главнейшие вопросы, требующие разрешения в связи с дальнейшей разработкой нового метода**

1. Новый метод непосредственного подсчета клеток под микроскопом при разрешении вопросов чисто количественного анализа может давать менее условное, более адекватное решение, чем методы культивирования (особенно чашечный).

2. Разработанный мною вариант метода непосредственного подсчета, при чрезвычайной простоте и доступности, в отношении условной (математически вычисленной) точности едва ли уступает чашечному методу, по крайней мере для величин, превышающих 100 000 клеток в 1 см<sup>3</sup>.

3. Его точность может быть произвольно увеличена путем повышения числа просмотренных полей зрения, что при малочисленной микрофлоре не требует особенно большой затраты времени.

4. Продуктивность нового метода значительно превышает продуктивность чашечного метода (в смысле затраты времени и труда), он требует значительно меньших материальных затрат и чрезвычайно простой аппаратуры.

5. Новый метод счета может быть применен к учету микрофлоры в любом субстрате, если только нет основания предполагать в нем значительного количества мертвых клеток. Опыты применения метода к исследованию свежего молока, сыра и масла дали вполне удовлетворительные результаты. Можно думать, что и в других областях исследования (за пределами микробиологии молока) новый метод, в соответствующих вариантах, может найти столь же широкое применение.

6. Самостоятельное применение нового метода может быть особенно продуктивно: а) при исследовании свежего молока в целях практического контроля и б) при изучении динамики микробиологических процессов в чистых культурах тех или иных микроорганизмов.

7. При качественно-количественном исследовании сложных микробиологических процессов наиболее целесообразным представляется сочетание непосредственного подсчета с соответственными методами культивирования (чашечный метод, метод предельных разведений и т. п.).

8. Принципиальное расхождение результатов непосредственного подсчета и культурных методов (в частности чашечного) вследствие наличия мертвых клеток, повидимому, в большинстве случаев не так велико, как это принято думать. Однако этот вопрос требует более тщательного исследования.

Рекомендуя в настоящей статье широкое использование нового метода в различных областях количественных микробиологических исследований, я, конечно, не думаю, что форма, приданная ему мною, является неизбежной и окончательной. Несомненно, что при всей ее целесообразности, в отдельных деталях она может быть изменена, может быть лучше приспособлена к отдельным специальным случаям. Кроме того, независимо от техники самого метода, уже сейчас, в связи с его применением, намечается ряд вопросов, касающихся истолкования и использования его непосредственных результатов и требующих специальных исследований. В ходе предыдущего

изложения я попутно не раз отмечал как слабые места самого метода, так и вопросы, связанные с его применением. Теперь, заканчивая свою статью, я считаю полезным дать общую сводку всех этих пунктов и вопросов, насколько они наметились как в моей собственной практической работе, так и в работе моих сотрудников, чтобы таким образом набросать схематический план будущей работы, направленной к дальнейшей разработке и усовершенствованию метода. К этой работе я призываю всех тех, кто пожелает применить мой метод на практике.

1. Вопросы, связанные с техникой самого метода: в этом отношении наши усилия должны быть направлены главным образом по следующим линиям:

а) Вопросы технические в собственном смысле слова; сюда относятся: 1) разработка деталей техники предварительной подготовки материала в целях: а) его консервирования и б) достижения наибольшей гомогенности; 2) разработка способов окрашивания в целях с одной стороны достижения наибольшей яркости—особенно по отношению к элементам, отличающимся слабой способностью к окрашиванию, с другой—возможного дифференцирования живых элементов от мертвых (если это вообще возможно), а равно и качественно различных между собою элементов.

б) Вопросы математической разработки метода, касающиеся его точности и зависимости последней от различных условий, именно: 1) техники приготовления препарата, 2) техники счета—степени увеличения микроскопа, числа просчитанных полей зрения, числа просмотренных препаратов и т. п.

2. Вопросы, связанные с истолкованием непосредственных результатов метода и согласования их с результатами «культурных» методов, в частности чашечного. Здесь наиболее существенными вопросами, настоятельно требующими разработки, являются, следующие:

а) Вопрос о судьбе мертвых клеток, поскольку она отражается в микроскопической картине. Я уже имел случай отметить факты, стоящие в явном противоречии с общепринятым мнением, что в большинстве случаев клетки микроорганизмов после смерти еще долгое время остаются видимыми под микроскопом наравне с живыми клетками, не претерпевая никаких сколько-нибудь заметных изменений. Эти факты, как мы видели, состоят в том, что в ряде случаев приходится наблюдать чрезвычайно быстрое исчезновение бактериальных тел из поля зрения, и, что особенно интересно, это исчезновение довольно точно параллелизуется с вымиранием клеток, отмечаемым чашечным методом. Следовательно, в этих случаях можно вполне определенно говорить о том, что после смерти ячеек их тела почти тотчас же исчезают, как микроскопические

объекты с определенной структурой, во всяком случае они перестают быть видимыми. Правда, эти случаи носили несколько ненормальный, как бы патологический характер (в отмеченной работе Смирновой и Коноплевой); но некоторый намек на подобное же явление в условиях вполне нормальных и притом чрезвычайно широко распространенное — именно в микробиологических процессах, сопутствующих созреванию сыров,—дает нам сопоставление данных, полученных разными методами при анализе этих процессов. Отсюда очевидно, что вышеприведенное общепринятое мнение по этому вопросу требует точного и всестороннего пересмотра, основанного на экспериментальной проверке. Это исследование необходимо провести в следующих направлениях: 1) выяснение судьбы мертвых клеток (с интересующей нас точки зрения) в различных процессах стерилизации путем нагревания; 2) то же при стерилизации различными антисептиками; 3) то же при естественном вымирании клеток.

б) Не менее важное значение имеет более точное выяснение соотношений между результатами разных методов, поскольку они обуславливаются самой техникой последних, независимо от наличия мертвых клеток. Разумеется, коэффициенты этих соотношений могут быть лишь масштабного характера, но этот масштаб должен быть определен, если мы хотим использовать разные методы в целях их взаимного дополнения и корригирования. В особенности это важно вначале, пока новый метод учета лишь прокладывает себе путь в области, в настоящее время целиком обслуживаемые общепринятым, привычным методом чашечного подсчета, к которому приурочены и все нормы практической оценки, поскольку они основаны на данных микробиологического анализа (например, в деле контроля молока и молочных продуктов). Пока эти нормы не переведены, так сказать, на язык нового метода,—как мы видели, несколько отличный от старого языка,—необходимо перебросить мост между методами введением приблизительного переводного коэффициента

Определение такого коэффициента, хотя бы масштабного характера, предполагает, как необходимую предпосылку, установление твердой единицы счета по новому методу; ведь само собою понятно, что соотношения между результатами двух методов будут сильно меняться в зависимости от того, примем ли мы при счете за единицу всякую вполне созревшую, взрослую клетку, хотя бы и не отделившуюся еще после акта дробления, или всякое обособленное в поле зрения скопление клеток, независимо от того, является ли оно органически связанным или случайным, вторично объединенным. Я уже имел случай указать, что, по моему мнению, вообще говоря, более устойчивой и более точно различимой единицей представляется первая из только что указанных единиц. Однако возможно,

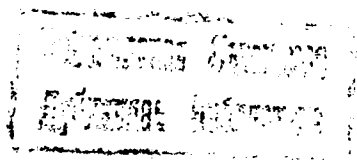
что в отдельных случаях, при решении каких-либо специальных задач, окажется более целесообразным остановиться на второй единице; решение этого вопроса для разных типов задач можно найти лишь путем углубленного математического анализа цифр соответственных параллельных рядов,—и эту работу также необходимо, конечно, учесть в общем плане намеченных работ.

---

Предлагая к разработке изложенную схему, я не думаю, конечно, что она вполне исчерпывает все вопросы, всплывающие в связи с применением новой методики исследования. Не думаю я и того, что эта работа будет выполнена каким-нибудь одним работником или даже одним учреждением, притом сразу, в порядке развертывания единого принятого плана. Эта работа представляется мне скорее, как ряд отдельных разведок, выполняемых отдельными работниками, так сказать, попутно, в ходе реальной аналитической работы с применением нового метода. Желательно однако, чтобы они все-таки были объединены некоторым общим, хотя бы и схематическим планом: в этом и заключается задача предлагаемой схемы.

Во всяком случае, мне думается, было бы большой методологической ошибкой воздерживаться от применения нового метода, пока не все его детали окончательно разработаны: я полагаю, что уже и в настоящем своем состоянии метод может быть прекрасным орудием анализа во многих направлениях работы; детальная же его разработка и углубление,—как и для всякого метода,—лучше всего и полнее всего осуществляется в самом ходе его практического, повседневного применения.

---







56

86

101

СОДЕРЖАНИЕ

Л. К. Лапинский. К изучению границ коллоидного состояния фосфорно-кальциевых солей в присутствии некоторых электролитов и органических соединений . . . . . 7

Проф. С. А. Королев. Новый метод непосредственного счета клеток под микроскопом в общем плане микробиологического учета 33

---





