

В. Г. Туманян, Л. Б. Саруханян

О распространении бактериофага *Bac. megaterium* в почве

Изучение бактерио- и актинофагии в последнее время привлекло внимание большого числа исследователей. Наряду с актуальностью выяснения природы фагов и различных вопросов практического их использования важное значение имеют работы по изучению распространения фагов в почве и в других естественных субстратах. В этом отношении особый интерес представляет распространение в почве фагов к культурам микроорганизмов, имеющих важное значение для сельскохозяйственного производства, — к клубеньковым бактериям, фосфорбактериям, бактериям-активаторам и другим микроорганизмам, играющим большую роль в развитии растений.

Надо отметить, что фаги играют значительную роль в изменчивости актиномицетов и бактерий, и углубленное изучение этого вопроса внесет много ценного в выяснение явления фагии в биологии различных групп микроорганизмов в природе.

Из почвенных бактерий сравнительно больше изучена бактериофагия клубеньковых бактерий (Швецова, 1944; Доросинский, 1941; Калниньш, 1956). Другим объектом, привлекающим внимание исследователей, является группа бактерий *Bac. megaterium*, используемая для производства бактериального земледобрильного препарата — фосфоробактерина (Раутенштейн, 1955; Доросинский и Кварацхелия, 1958). Помимо чисто производственного значения изучения явления бактериофагии *Bac. megaterium* var. *phosphaticum*, следует подчеркнуть необходимость проведения всесторонних исследований по выяснению различных вопросов распространения бактериофага данной группы бактерий в почве. Неэффективность использования фосфоробактерина мо-

жет быть связана с широким распространением в почве бактериофага к фосфобактериям, как это было отмечено рядом авторов в случае применения нитрагина. Надо отметить, что, по данным Доросинского и Кварацхелия (1956), в нестерильной почве фаг *Bac. megaterium* var. *phosphaticum* быстро разрушается и теряет свои литические свойства.

Нами было изучено распространение бактериофага к различным культурам группы *Bac. megaterium* на материале 45 образцов различных типов почв.

Культуры *Bac. megaterium*, к которым выделялись фаги, были выделены, изучены и идентифицированы в нашей лаборатории Э. К. Африкян. Поскольку нас интересовало распространение в почве разных типов бактериофага к *Bac. megaterium*, в работе применялись различные разновидности данного вида. Почвенные образцы, из которых производилось выделение фагов, были взяты из активного пахотного слоя на глубине 0—30 см. Методика, применявшаяся для целей выделения фага к культурам *Bac. megaterium*, заключалась в следующем. Жидкая питательная среда (испытывались разные среды, из которых мы остановились на пептонной воде с содержанием 2% пептона и 1% сахарозы) засеивалась культурой тест-организма и ставилась в термостат на 37°C. Спустя 5—6 часов к среде добавлялась почва из расчета 5 г на 50 мл среды — тщательно перемешивалась в течение 30 минут и инкубировалась в термостате при 27°C в стационарных условиях. Спустя двое суток производилось выделение фага, для чего питательная среда с почвой пропускалась вначале через бумажный, а затем через фильтр Зейтца. Наличие фага выявлялось двумя способами — методом „дорожек“ и заражением свежей культуры, служившей фоном для выделения фага. „Дорожечный“ метод производился на чашке Петри с МПА, засеянной культурой тест-организма, на которую наносились две капли фильтрата и наклоном чашки распространялись по поверхности среды. При наличии фага образовывалась стерильная зона или негативные колонии фага.

Для другого способа, служившего одновременно методом активации и размножения фага, применялись свежие

4—6-часовые культуры тест-организма на жидкой питательной среде в пробирках. При наличии фага отмечалось просветление питательной среды с культурой бактерий, куда вносились 1—2 капли фильтрата испытуемой почвы. Рассевом фаголизата на питательной среде в чашках, засеянной той же культурой бактерий, получались негативные колонии фагов, из которых последовательными рассевами на газоне этой бактериальной культуры производилась очистка выделенного фага. Наши опыты показали, что фаг к *Vac. megaterium* весьма распространен в обследованных почвах, и его получение не представляет особых затруднений.

В табл. 1 приведены данные о выделении фагов из различных типов почв по описанному выше способу.

Таблица 1
Результаты опытов по выделению фагов
к *Vac. megaterium* из разных почв

Типы почв	Всего испытано образцов	Получено фагов
Бурые	36	27
Каштановые	6	5
Чернозем	1	—
Горно-луговые	2	2
Всего	45	34

Как показывают данные приведенной таблицы, из 45 испытанных образцов почв было выделено 34 фага, которые по своим биологическим особенностям различались между собой. Нельзя сказать, что распространение фагов к *Vac. megaterium* связано с распределением в почве бактерий этой группы. Так, фаг к *Vac. megaterium* был выделен из горно-луговых образцов почвы горы Арагац, где не было установлено при микробиологическом анализе наличие бактерий данного вида. В то же время приблизительно в 1/3 обследованных образцов бурых почв, характеризующихся

широким распространением бактерий *Bac. megaterium*, не удалось выделить фаги к этому виду.

В табл. 2 приведены сведения о почвенных образцах, из которых были выделены 34 различных фага к *Bac. megaterium*. Как показывает данная таблица, в целях выделения фагов использовались образцы различных типов почв, занятых разным растительным покровом. В ряде случаев к одной культуре бактерий производилось выделение фагов из различных типов почв, и наоборот.

Бактериофаги, выделенные нами из разных почв, как правило, сохранялись в активном состоянии в течение 3—4 месяцев до их следующего активирования на соответствующих культурах.

После очистки полученных фагов был проведен их типаж по литическому действию по отношению к 30 различным культурам *Bac. megaterium*. Литическое действие испытывалось дорожечным методом на газонах бактериальных культур в чашках Петри в трехкратной повторности.

В табл. 3 приведены выборочные данные опытов по литическому действию выделенных фагов на различные культуры *Bac. megaterium*. Результаты этих испытаний показывают, что выделенные фаги характеризуются весьма различной спецификой действия в отношении использованных культур *Bac. megaterium*. Некоторые из них (фаги № 2, 4, 12, 19) весьма специфичны, моновалентны, лизируют лишь отдельные культуры определенной разновидности *Bac. megaterium*. Другие бактериофаги имеют широкий спектр действия и некоторые из них (№ 8, 13) активно лизируют большинство из испытанных культур данного вида. Большинство выделенных нами фагов не являлись строго специфичными и обладали литическим действием на представителей различных разновидностей *Bac. megaterium*.

Наблюдения над характером литического действия показали, что у бактерий *Bac. megaterium* весьма быстро развиваются резистентные к испытываемым фагам культуры.

При испытании в чашках по методу „дорожек“, стерильные зоны фаголизиса спустя 3—4 суток заполнялись вторичным ростом тест-культуры *Bac. megaterium* (рис. 1).

Таблица 2

Фаги группы *Bac. megaterium*

№ фатов	Место выделения, почва, растительный покров и агрофон	Культура бактерий и штаммы
1	Эчмиадзин, опытное поле Ин-та земледелия, бурая почва, хлопчатник, 1-е поле, азот + аммиачная селитра	<i>Bac. megaterium</i> № 10
2	Там же	№ 14
3	Опытное поле Ин-та земледелия, бурая почва, люцерна 5-й год, влажная, полив 4—5 дней назад	№ 14
4	Там же	№ 10
5	С. Элар, каштановая почва, люцерна 4-й год, 1957 г.	№ 10
6	Там же, пшеница, 1957 г.	№ 10
7	Там же, люцерна 4-й год, 1957 г.	№ 10
8	Там же, табак, 1957 г., каштановый	№ 10
9	С. Калинино, Карахач, горно-луговая почва	№ 10
10	Там же, горно-луговая	№ 10
11	С. Элар, каштановая почва, томат	№ 10
12	Эчмиадзин, опытное поле Ин-та земледелия, бурая почва, люцерна 2-й год, предш. пшеница	№ 16
13	Там же, хлопчатник 3-го года	№ 16
14	Там же, хлопчатник 3-го года	№ 15
15	Там же	№ 14
16	Там же, пшеница 2-й год	№ 14
17	Там же, неокulturенная	№ 14
18	Там же, гузкорчевание, хлопчатник 3-го года	№ 14
19	Там же, зяблевая вспашка с отвалом, хлопчатник 2-го года	№ 10
20	Там же, гузкорчевание, весеннее чизелевание, хлопчатник	№ 10
21	Там же, неспаханная	№ 10
22	Там же, кукуруза 2-й год	№ 10
23	Там же, зяблевая вспашка с отвалом	№ 10
24	Там же, гузкорч. + весеннее чизелевание + боронование, хлопчатник	№ 10
25	Там же, хлопчатник 12-го года без удобрений	№ 10
26	Там же, хлопчатник 4-го года	№ 10
27	Там же, люцерна 3-го года	№ 10
28	Там же, весенняя вспашка с отвалом	№ 10
29	Там же, хлопчатник 12-го года, азот + фосфор + KCl	№ 10
30	Там же, хлопчатник 3-го года	№ 10
31	Там же, 1-е поле, хлопчатника 12-го года, азот + фосфор + KCl + навоз	№ 10
32	Там же, гузкорчевание + весеннее чизелевание + боронование	№ 10
33	Там же, зяблевая вспашка с отвалом + весеннее чизелевание + боронование	№ 12
34	Там же	№ 21

Таблица 3

Действие различных фагов на культуры *Vac. megaterium*
(1+1— наличие, 1—1— отсутствие литического действия фага)

№ куль- тур	Фаги Вид	Литическое действие фагов																	
		1	2	4	5	8	9	10	11	12	13	16	17	19	20	22	24	25	29
1	Вас. megaterium	+	—	+	+	+	+	—	+	—	+	—	+	+	+	+	—	+	+
2	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	"	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
6	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
8	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	"	+	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+
10	"	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	+
11	"	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
12	"	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
13	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	"	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
26	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—



Рис. 1. Литическое действие бактериофага № 13 на культуру *Vac. megaterium* штамм № 16. А—фаголизис спустя 24 часа. В—та же чашка после инкубации трое суток.

Подобное явление отмечалось и на жидких питательных средах. Быстрое привыкание и развитие резистентных форм к действию фага среди культур *Bac. megaterium* по-видимому и объясняет отсутствие литического действия его на *Bac. megaterium* в условиях почвы, отмеченное Доросинским и Кварацхелия (1958).

Из проведенных нами опытов можно заключить:

1. Фаги к культурам *Bac. megaterium* весьма широко распространены в различных почвах и их удается выделить из почвы довольно легко.

2. Распространение и частота выделения фага к культурам *Bac. megaterium*, по-видимому, не стоит в связи с распространением в почве бактерий данного вида.

3. Из обследованных почв удается выделить фаги к группе *Bac. megaterium* с весьма различной спецификой литического действия. В преобладающем большинстве случаев выделяются фаги с широким спектром литического действия.

Վ. Գ. ԹՈՒՄԱՆՅԱՆ, Լ. Բ. ՍԱՐԴԻՍԱՆՅԱՆ

ՀՈՂՈՒՄ *BAC. MEGATERIUM* ԲԱԿՏԵՐԻՈՖԱԳԻ ՏԱՐԱԾՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Մեր կողմից ուսումնասիրվել է տարբեր տիպի հողերի 45 նմուշ, որոնցից ստացվել են 34 ֆագ *Bac. megaterium* խմբի հանդեպ:

Կատարված հետազոտություններից պարզվել է հետևյալը՝

1. *Bac. megaterium* խմբի հանդեպ ստացված ֆագերը լայն տարածվածություն ունեն տարբեր տիպի հողերում և նրանց մեկուսացումը առանձին դժվարություն չի ներկայացնում:

2. Կարելի է ենթադրել, որ *Bac. megaterium* խմբի ֆագերի տարածվածությունը և նրանց հաճախակի մեկուսացումը հավանաբար կապված է հողում սովյալ խմբի բակտերիաների տարածվածության հետ:

3. Հետազոտված հողերից հաջողվել է մեկուսացնել *Bac. megaterium* խմբի ֆագեր խիստ տարբեր լիտիկ հատկություններով: Ֆագերի գերակշռող մեծամասնությունը ունեն լիտիկ ազդեցություն լայն սպեկտր:

V. G. Tumanian, L. B. Sarouchanian

On the distribution of *Bac. megaterium* bacteriophages in soils

Summary

The distribution of *Bac. megaterium* bacteriophages in 45 samples of various types of soils has been studied. From the investigated samples 34 bacteriophages have been isolated.

It has been shown that *Bac. megaterium* bacteriophages distribution in soils are not connected with the occurrence of *Bac. megaterium*.

The lytic action of isolated bacteriophages on 30 different cultures of *Bac. megaterium* has been studied.

ЛИТЕРАТУРА

- Доросинский Л. М. 1941. Влияние бактериофага на развитие клевера. „Микробиология“, т. 10, в. 2.
- Доросинский Л. М. и Кварацхелия М. Т. 1958. Влияние бактериофага на развитие *Bac. megaterium* var. *phosphaticum* в почве. Труды Вс. н.-и. ин-та с.-х. микробиологии, т. 15, 68.
- Калинйш А. Д. 1956. Распространение фага клубеньковых бактерий клевера в почвах Латв. ССР. Вопросы с.-х. микробиологии (Рига), в. IV.
- Раутенштейн Я. И. 1955. Бактериофагия. Общие сведения о явлении фагии и его значение в ряде производств. Изд. АН СССР, М.
- Щецова О. И. 1944. Бактериофаг и клубеньковые бактерии. „Микробиология“, т. 13, в. 2—3.