

БИОЛОГИЯ

В. Г. Айрапетян

О направленной изменчивости бактерий из группы
Пастерелла

(Представлено М. А. Тер-Карапетяном 5 X 1953)

Вегетативная гибридизация создает возможность осуществлять направленную изменчивость живых форм, в том числе и микроорганизмов.

В настоящее время трудами советских ученых уже накоплено большое количество фактов, подтверждающих плодотворность применения метода вегетативной гибридизации в микробиологии.

Грачева (¹) показала, что при длительном выращивании кишечной палочки (*B. coli* commune) на синтетической среде, содержащей в качестве источника азота убитые микробные тела одной из бактерий паратифозной группы—*B. Breslau*—и сыворотку кролика, кишечная палочка приобретает биохимические, вирулентные и антигенные свойства *B. Breslau*. Эти данные Н. Ф. Гамалея (²) считал примером вегетативной гибридизации у микроорганизмов.

Аналогичные данные были получены также Тимаковым (³), Калиным (⁴) и др. по превращению одного вида микроба в другой путем предоставления первому виду продуктов распада второго вида и, в частности, специфических нуклеопротеидов.

В настоящей работе мы приводим результаты наших исследований по вегетативной гибридизации между микроорганизмами, принадлежащими к далеко стоящим друг от друга видам—*Pasteurella bovisepitum* и *B. coli*. Результаты эти были получены путем добавления к среде, посеянной *P. bovisepitum*, продукта распада *B. coli* и, наоборот, путем добавления в среду, где развивались *B. coli*, продукта распада *P. bovisepitum*.

Для культивирования взаимно воспитываемых штаммов бралась синтетическая среда Тиродэ, которая разливалась по 5 мл в пробирки и автоклавировалась при 2 атм. в течение 15 минут. pH среды равнялась 7—7,2.

P. bovisepitum в жидкости Тиродэ не культивируется—массовое отмирание микробов наступает через 2—3 дня после посева.

B. coli же сохраняется в этой среде несколько дольше—отмирание бактерий происходит после 5—6-го пересева.

В качестве источника азотистых продуктов к среде прибавлялось перед посевом определенное количество убитых микробных тел: в одних случаях *B. coli*, в других—*P. bovisepiticum*. В другой ряд пробирок, кроме микробных тел, к жидкости Тиродэ прибавлялась стерильная неинактивированная сыворотка здорового кролика в количестве 0,25 мл.

Микробные тела, используемые в качестве источника азота, смывались жидкостью Тиродэ с поверхности мясопептонного агара (МПА) после суточного роста при 37°C, титровались до содержания 2 миллиардов микробных тел по стандарту, затем прогревались в водяной бане: при 75°C в течение 30 минут для *B. coli* и при 80°C в течение 30 минут для *P. bovisepiticum*. Стерильность микробных взвесей проверялась высевами на обычных питательных средах, а *P. bovisepiticum* еще и введением подкожно белой мыши в количестве 0,5 мл. Взвеси считались пригодными к использованию, если в течение 5 суток посевы оставались стерильными, а белые мыши—живыми. В качестве воспитываемого объекта было взято: а) *P. bovisepiticum*—штамм „1337“, выделенный из крови крупного рогатого скота, долгие годы применявшийся в нашей лаборатории в качестве вакцинного и отличавшийся хорошо выраженной антигенностью и высокой вирулентностью; 0,1 мл суточной бульонной культуры этого штамма убивает белую мышь в течение 18—24 часов и 2-годовалого бычка в течение 24—36 часов. В мазках из органов и крови павших животных всегда усматриваются хорошо выраженные, биполярно окрашенные коккобактерии. Микроб этот—грамм-отрицательный, неподвижная коккобацилла, растущая на косом агаре в виде мелких бесцветных, прозрачных колоний (как роса), а в мясопептонном бульоне образующая равномерную нежную муть. Сбраживает только глюкозу с образованием кислоты и газа, желатину не разжижает, молоко не свертывает; б) *B. coli*—лабораторный штамм „1520“, выделенный из кишечника теленка, был типичным для этого вида микроба во всех отношениях.

Схема постановки опытов представлена в табл. 1.

Основной посев воспитываемых штаммов производился петлей с суточной агаровой культуры, при дальнейших пересевах пастеровскими пипетками (приблизительно одинакового диаметра)—в количестве 4 капель.

После пересева пробирки ставились в термостат на 24 часа при 37°, затем на 5 дней при комнатной температуре. На 7-й день от начала опыта производились следующие пересевы из каждой пробирки в такую же пробирку с аналогичной средой и затем выдерживались в том же порядке.

Таблица 1

№№ пробирок	Основная питательная среда	Источники азота		Воспитываемые штаммы	
		убитые микробные тела в количестве 2 млрд. в 1 мл	сывотка кролика	Past. bovisеpticus „1337“	B. coli „1520“
1	Жидкость Тиродэ 5 мл	B. coli	0,25	Штамм „1337“	—
2	То же	B. coli	—	Штамм „1337“	—
3	То же	Past. bovisеpticum	0,25	—	Штамм „1520“
4	То же	Past. bovisеpticum	—	—	Штамм „1520“
	Контрольн. пробирки				
5	Жидкость Тиродэ 5 мл	—	—	—	Штамм „1520“
6	То же	—	—	Штамм „1337“	—
7	То же	—	0,25	—	Штамм „1520“
8	То же	—	0,25	Штамм „1337“	—

Одновременно из содержимого каждой опытной пробирки 1—2 капли переносились пастеровской пипеткой в отдельные чашки Петри на среду „Эндо“ и шпатель расщивались по всей поверхности среды. Чашки на сутки ставились в термостат при 37°C, после чего изучались колонии. Тут же представлявшие интерес колонии пересевались на косо́й агар и среды для изучения биохимических свойств.

Обычно выделялись те колонии, которые на среде „Эндо“ проявляли нехарактерный рост, т. е. когда появлялись красные колонии из пробирок, где пастерелла воспитывалась на убитых B. coli, и бесцветные колонии из пробирок, на которых коли воспитывались на убитых P. bovisеpticum.

Всего было проведено 3 серии однотипных опытов, причем каждая серия доводилась до 7-го пассажа. Из всех 3 серий опытов во всех пассажах получались одинаковые показатели.

Результаты наших наблюдений сводятся к следующему: Past. bovisеpticum, воспитываемые на убитых микробных телах B. coli в присутствии кроличьей сыворотки, остаются жизнеспособными в течение всех 7 пассажей, давая при этом характерный рост на МПА и отсутствие роста на „Эндо“, как и исходная культура. На 7-м же пассаже характер роста на этих средах резко меняется. На среде „Эндо“ появляются мелкие красные лактозоразлагающие колонии; на МПА же рост более пышный, приближающийся к росту микробов кишечной группы, но не характерный для исходной культуры P. bovisеpticum. Суточная бульонная культура от этих красных колоний в дозе 0,2 мл вызывает смерть белой мыши на 3-й день, причем в мазках из органов мыши было видно множество коротких, хорошо красящихся коккобактерий, напоминающих морфологию пастерелл, однако биполярно окрашенные почти совершенно не встречаются. Эти красные колонии трансформанты и по своим биохимическим свойствам резко отличаются от исходной культуры. Они становятся весьма ак-

тивными, и разлагают, с образованием кислоты и газа, лактозу, глюкозу, маннит, мальтозу и проч., но не разлагают сахарозу и дульцит; исходная же культура отличается тем, что разлагает только глюкозу без образования газа, обладает высокой вирулентностью и в мазках из органов окрашивается биполярно.

Эти же *Past. bovisepcticum*, воспитанные на убитых телах *B. coli*, без наличия кроличьей сыворотки, пассажируются без изменения своих свойств. В среде же только с кроличьей сывороткой *P. bovisepcticum* не размножается, более устойчивые особи сохраняются до 3—4-го пассажа, а затем вымирают. В жидкости же Тиродэ, без источника азота, они погибают в течение первых же дней.

B. coli, как во многих других, так и в нашем опыте, проявляют большую склонность к изменчивости. В присутствии убитых *P. bovisepcticum* и кроличьей сыворотки с 5-го пассажа появляются лактозонеразлагающие колонии, сначала единичные, а уже с 7-го пассажа все бесцветные, у некоторых из которых в центре слабо-розовая точка. В пробирках, в которых имеется только кроличья сыворотка без убитых *P. bovisepcticum*, бесцветные колонии появляются со 2-го пассажа, сохраняющиеся до 6-го, а затем вообще перестающие расти как на среде „Эндо“, так и на косом агаре. На жидкости Тиродэ без источника белка кишечная палочка сохранялась в нашем опыте до 5-го пассажа, а затем на контрольных средах переставала расти. Эти бесцветные колонии лактозонеразлагающей кишечной палочки по биохимическим своим свойствам отличаются от исходной культуры тем, что на цветных средах перестают вызывать газообразование.

Суммируя полученные данные, мы усматриваем после опыта в воспитываемых штаммах определенные изменения, которые приведены в табл. 2.

Таблица 2

Критерий изменчивости	P. bovisepcticum		B. coli	
	До опыта	После опыта	До опыта	После опыта
1. Морфология	Коккобактерии Биполярность+ Грам—	Коккобактерии Биполярность— Грам—	Короткие палочки Грам—	Без изменения
2. Биохимические свойства на средах с: глюкозой лактозой другими сахарами*	К+Г—	К+Г+	К+Г+	К+Г—
	К—Г—	К+Г+	К+Г+	К—Г—
	К—Г—	К+Г+	К+Г+	К+Г—
3. Вирулентность	Убивает белую мышь за 18—24 часа	Убивает белую мышь за 72 часа	—	—

Приведенные нами наблюдения показывают, что направленная изменчивость возможна не только между близко стоящими видами

* Применялись среды, содержащие: маннит, мальтозу, арабилозу, ксилозу и другие.

микроорганизмов, но и между далеко стоящими друг от друга видами патогенных микробов, путем изменения типа ассимиляции, типа обмена веществ (5).

Армянский научно-исследовательский
ветеринарный институт

Վ. Գ. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ

Պաստյորելա խմբի բակտերիաների նպատակագիր վերափոխման մասին

Վեցերորդի դարի հիբրիդիզացիան հնարավորություն է տալիս իրադրոժելու կենդանի տեսակների, այդ թվում և միկրոօրգանիզմների նպատակագիր վերափոխումը:

Այս ուղղությամբ սկսող Գամալեյայի լաբորատորիայում Գրաչևայի կողմից *Bacterium coli comm.*-ի մասին բերված սկզբնական արդյունքներին բաղաժեպ նոր փաստեր ալելացվեցին սովետական միկրոօրգանիզմների կողմից: Այս փորձերով հաստատվել է, որ երբ տվյալ տեսակի միկրոօրգանիզմը զարգանում է նշան խմբին պատկանող, բայց ուրիշ տեսակի մի միկրոօրգանիզմի քայքայման նյութերի ներկայությամբ, առաջին միկրոօրգանիզմը ձեռք է բերում երկրորդի հատկությունները:

Ներկա աշխատությունում բերվում են Գրաչևայի մշակած մեթոդով մեր կողմից ստացված արդյունքները, երբ *Pasteurella bovisepitum* բակտերիան դաստիարակվում է մի այլ խմբի պատկանող *B. coli*-ի քայքայման նյութերի վրա, և ընդհակառակը, երբ *B. coli*-ն դաստիարակվում է *P. bovisepitum*-ի քայքայման նյութերի վրա:

Հետազոտությունների սխեման, որը բերված է աղյուսակ 1-ում, ցույց է տալիս, որ դաստիարակման ենթակա բակտերիաների ամեն մի տեսակը աճեցվում է Տիրոգէի լուծույթի մեջ, որին ալելացված է որպես ազոտի աղբյուր մի վարիանտում միայն ճազարի շիճուկ, իսկ մյուս վարիանտում միաժամանակ ճազարի շիճուկ և մյուս տեսակի բակտերիաների սպանված ըջիջները (քայքայման նյութերը): Դաստիարակման գործողությունը կատարվում է միևնույն միջավայրում՝ 7 հաջորդական ցանումներով (պասաժ):

Մեր հետազոտությունները հանգել են հետևյալ արդյունքներին:

Միայն Տիրոգէի միջավայրում (կոնտրոլ) թե *P. bovisepitum*-ը և թե *B. coli*-ն նորմալ աճ չեն ցուցաբերում:

Ճազարի շիճուկով հարստացված Տիրոգէի միջավայրում և *P. bovisepitum*-ը և թե *B. coli*-ն աճում են մինչև 5—6-րդ պասաժը, բայց վերափոխման երևույթ չեն ցուցաբերում:

Վերջապես, երբ Տիրոգէի միջավայրը հարստացվում է միաժամանակ ճազարի շիճուկով և քայքայված բակտերիաների նյութերով, աճող միկրոօրգանիզմը ձեռք է բերում սպանված միկրոօրգանիզմների յուրահատկությունները: Այսպես, փորձի վերջում *P. bovisepitum*-ը ցուցաբերում է *B. coli*-ի, և ընդհակառակը *B. coli*-ին ցուցաբերում է *P. bovisepitum*-ի հատկությունները:

Փորձարկված շտամների մորֆոլոգիական, բիոքիմիական և վիրուլենտության հատկությունների վերափոխման արդյունքները բերված են 2 աղյուսակում:

Մեր հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ բակտերիաների ղեկավարված վերափոխումը կարելի է կատարել ոչ միայն իրար մոտ գտնվող տեսակների միջև, ինչպես հայտնի է գրականության մեջ, այլ նաև մեկը մյուսից հեռու գտնվող տարբեր խմբերի պատկանող միկրոօրգանիզմների տեսակների միջև:

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ Н. П. Грачева, Агробактериология, 1946. ² Н. Ф. Гамалея, Агробактериология. ³ В. Д. Тимаков, Направленная изменчивость микробов, доклад на совещании руководителей ин-тов эпид. и микр., М., 1950. ⁴ Г. П. Калина, Вегетативная гибридизация и направленная изменчивость бактерий, Госмедиздат, Киев, 1952. ⁵ Т. Д. Лысенко, Агробактериология, М., Сельхозгиз, 1948.