

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ЛИЗОГЕНИИ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
 К ФАГАМ КУЛЬТУР *BACILLUS THURINGIENSIS*
 VAR. *CAUCASICUS*

Я. И. РАУТЕНШТЕЙН, Н. Я. СОЛОВЬЕВА, Т. Б. БЛОХИНА,
 Л. Н. МОСКАЛЕНКО, Л. С. ХАЧАТРЯН

Установлено, что штаммы изученного серотипа *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* в лабораторных условиях спонтанно не образуют вирулентных мутантов умеренных фагов, что открывает большие перспективы для создания на их основе инсектицидных препаратов. Проведено электроно-микроскопическое исследование новых фагов этого вида.

Ключевые слова: фаз, бактериальный препарат.

Многолетние исследования советских и зарубежных ученых убедительно показали высокую эффективность и перспективность применения спороносных кристаллообразующих бактерий в борьбе с насекомыми—вредителями растений. Для изготовления энтомоцидных препаратов применяются, главным образом, спороносные бактерии вида *Bac. thuringiensis*.

Как известно, абсолютное большинство культур вида *Bac. thuringiensis* лизогенно, многие из них являются полилизогенными [2, 6, 7, 9, 10, 12, 14].

При производстве энтомоцидных препаратов часто наблюдается фаголизис производственных культур.

Существуют два источника занесения вирулентных фагов на производства. Основным из них являются лизогенные производственные культуры. Лизис в данном случае вызывается вирулентными мутантами умеренных фагов этих культур.

Причиной фаголизиса может также явиться инфицирование производственной культуры на одном из этапов изготовления энтомоцидных препаратов фагом, занесенным на производство извне. Следует учесть, что фаги, способные вызывать лизис культур вида *Bac. thuringiensis*, широко распространены в природе и встречаются во многих почвах [6]. Большой частью это полифаги, обладающие широким спектром литического действия и способные лизировать различные разновидности (серотипы) *Bac. thuringiensis*. Фаги из лизогенных культур весьма специфичны [10].

Борьба с фаголизисом в производственных условиях требует применения комплекса мероприятий.

В данной статье мы касаемся одного из важных мероприятий по борьбе с фаголизисом, а именно подбора культур, устойчивых к определенным фагам. Получение таких культур возможно двумя путями: экспериментально или селекцией из природных источников. Однако следует иметь в виду, что невозможно получить экспериментально, или выделить из природных источников культуры, устойчивые ко всем фагам, способным их лизировать. Это вполне понятно, так как одна и та же культура может лизироваться большим количеством активных против нее фагов, отличающихся друг от друга по морфологии частиц, серологическим свойствам, спектру литического действия, вирулентности и другим признакам. Это в полной мере относится к культурам *Bac. thuringiensis*. Поэтому мы считаем более правильным применение термина «получение культур, устойчивых к определенным фагам», чем широко применяемого, но не вполне правильного по существу термина «получение фагоустойчивых культур».

Известно, что экспериментальное получение культур, устойчивых к определенным фагам, возможно двумя принципиально различными способами: воздействием данным фагом и выделением устойчивых к нему вариантов из вторичного роста и воздействием мутагенных факторов. Этими методами удалось получить и успешно использовать в практических целях продуценты ряда биологически активных веществ, в особенности антибиотиков. Существует еще один источник получения активных и устойчивых к определенным фагам культур: выделение их из природных источников. Этот путь может быть успешно применен и при селекции культур энтомоцидных бактерий вида *Bac. thuringiensis*.

Выполненные нами исследования показали, что все встречающиеся в природных условиях культуры вида *Bac. thuringiensis*, хотя и являются лизогенными, но могут резко различаться по особенностям своей лизогении, свойствам содержащихся в них фагов и чувствительности к определенным фагам [11].

Так, культура *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*, применяемая для изготовления препарата энтобактерина, легко образует вирулентные мутанты своих умеренных фагов как спонтанно, так и под влиянием антибиотика ванкомицина [10, 11].

Культуры *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus*, применяемые для изготовления препарата дендробациллина, и *Bac. insectus*—продуцент препарата инсектина—отличаются тем, что у них спонтанное образование вирулентных мутантов их умеренных фагов в лабораторных условиях не наблюдалось, и они у них очень редко возникали при воздействии антибиотиком ванкомицином.

Фаги, выделенные из *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*, лизировали только культуры данной разновидности, а фаги из *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus* были активны против этих культур и культур *Bac. insectus*, но не лизировали культуры других разновидностей *Bac. thuringiensis* [10].

Эти различия между культурами разных разновидностей *Bac. thu-*

ringiensis имеют большое теоретическое значение и могут быть успешно использованы в практических целях—в комплексе мероприятий по борьбе с фаголизисом.

В данной работе приводятся результаты изучения особенностей лизогении культур *Bac. thuringiensis var. caucasicus* и чувствительность этих культур к фагам, содержащимся в лизогенных культурах других разновидностей *Bac. thuringiensis*.

Материал и методика. В работе были использованы три культуры *Bac. thuringiensis var. caucasicus* (805, 811 и 837), полученные из коллекции микроорганизмов Института микробиологии АН АрмССР, и ряд культур других разновидностей *Bac. thuringiensis*, использованных в качестве возможных индикаторных культур при выявлении лизогении у *Bac. thuringiensis var. caucasicus* и при изучении чувствительности других культур вида *Bac. thuringiensis* к разным фагам. В опытах применяли следующие фаги:

1. Д₁ и Д₄₉, выделенные при фаголизисе продуцента дендробациллина *Bac. thuringiensis var. dendrolimus* в производственных условиях;
2. 48к и 54к—вирулентные мутанты умеренных фагов *Bac. thuringiensis var. dendrolimus*, полученные при воздействии на культуру антибиотиком гентамицином;
3. 1-97, выделенный при фаголизисе *Bac. thuringiensis var. gallieriae* шт. 1-97, в производственных условиях;
4. ряд вирулентных мутантов умеренных фагов разных культур *Bac. thuringiensis var. gallieriae*, полученных воздействием на эти культуры антибиотиком ванкомицином.

Установление лизогенного состояния культур *Bac. thuringiensis var. caucasicus* проводили следующим образом: культуры выращивали на качалке в пептонно-кукурузном бульоне (ПКБ) в течение 48 ч [8]. Через 24 и 48 ч в центрифугатах испытуемых культуральных жидкостей определяли наличие фага путем нанесения центрифугатов на свежеприготовленные газоны индикаторных культур на пептонно-кукурузном (ПКА) и мясо-пептонном (МПА) агаре.

Чувствительность культур к фагам определяли путем нанесения 1—2 капель суспензии исследуемого фаголизата на свежеприготовленные газоны опытных культур. При наличии на газоне тест-культур зон лизиса на местах нанесения фаголизата перевиваемостью устанавливали, вызываются ли они фагом. Титрование фагов проводили двуслойным методом. В качестве нижнего слоя применяли 1,5% ПКА, а верхнего 0,7% ПКА.

Препараты для электронной микроскопии готовили с помощью дифференциального центрифугирования при 3000 об/мин (30—40 мин) и 40000—50000 об/мин (1,0—1,5 ч). Препараты контрастировали 2%-ной фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК) и просматривали в электронном микроскопе УЕМ-7 [5].

Получение антифаговых сывороток к опытным фагам проводили по Адамсу [1], нейтрализацию фагов антифаговыми сыворотками—в бульонной среде при 30° в ультратермостате.

Для выяснения возможности получения вирулентных мутантов умеренных фагов лизогенных культур были использованы антибиотики ванкомицин и гентамицин. Для этого на свежеприготовленные газоны опытных культур на МПА и ПКА наносили две капли определенных разведений антибиотика в стерильной дистиллированной воде. Чашки выдерживали при 28° и просматривали через 24 ч.

Участки газона, на которых наблюдались зоны лизиса или угнетение роста опытных культур, переносили в пробирки с мясопептонным бульоном. Наличие вирулентного фага устанавливали выделением его и последующим размножением на той культуре, на газоне которой он был выявлен.

Результаты и обсуждение. Первые опыты по изучению чувствительности культур *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* к фагам, активным против других разновидностей *Bac. thuringiensis*, нами (Хачатрян) были проведены в 1966 г. В этих опытах были использованы следующие фаги: фаг Д₁, выделенный при фаголизисе производственной культуры *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus* в производственных условиях; фаг П-2, выделенный и описанный Швецовою [15], и ряд фагов, выделенных из разных культур *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*.

Все три опытные культуры *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* (805, 811 и 837) оказались устойчивыми к исследованным фагам.

Эти культуры были выделены и детально изучены Африкяном с соавторами [2—4]. На их основе были изготовлены препараты БИП-805, БИП-811 и БИП-837, которые оказались весьма эффективными в борьбе с вредными насекомыми.

В связи с этим мы сочли важным более детально изучить указанные культуры. Особый интерес для нас представляло изучение чувствительности культур *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* (805, 811, 837) ко всем имеющимся в нашем распоряжении фагам.

В таблице приведены данные о сравнительной чувствительности к опытным фагам, выделенным в различных условиях, культур *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* (штаммы 805, 811, 837); *Bac. thuringiensis* var. *sotto-dendrolimus* (170 штаммов); *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* (75); *Bac. insectus* (21); *Bac. thuringiensis* var. *alesti* (3 штамма).

Таблица

Чувствительность к фагам культур разновидностей *Bac. thuringiensis*

Разновидности, серотипы	Количество изученных культур	Фаги, выделенные при фаголизисе var. <i>dendrolimus</i> в производственных условиях		Вирулентные мутанты умеренных фагов культуры var. <i>dendrolimus</i> , полученные под воздействием на культуру гентамицина (фаги 48к и 54к)	Фаг, выделенный при фаголизисе штамма 1—97 var. <i>galleriae</i>	Вирулентные мутанты умеренных фагов культур, полученные под воздействием ванкомицина (8 фагов)
		Д ₁ — специфичный фаг	Д ₁₀			
var. <i>caucasicus</i> (805, 811, 837)	3	—	—	—	—	—
var. <i>dendrolimus</i>	70	+	+	+	—	—
var. <i>galleriae</i>	75	—	—	—	+	+
<i>Bac. insectus</i>	21	+	+	+	—	—
var. <i>alesti</i>	3	—	—	—	—	—

Как видно из таблицы, культуры *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* отличались устойчивостью к фагам, активным против других разновидностей *Bac. thuringiensis*. Такой же устойчивостью обладали также испытанные три культуры серотипа *alesti*.

Для выявления лизогенного состояния культур *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* были использованы в качестве возможных индикаторных 52 культуры вида *Bac. thuringiensis*, принадлежащие к следующим разновидностям: *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*—22 штамма, *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus*—6, *Bac. insectus*—10, *Bac. thuringiensis* var. *alesti*—1, *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus*—3, другие разновидности—10. На всех исследованных разновидностях *Bac. thuringiensis*, за исключением некоторых штаммов *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*, выделить фаги из культур *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* не удалось. В отдельных опытах при нанесении культуральных жидкостей *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* штаммов 805, 811, 837 на газоны культур *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* на них появлялись зоны лизиса, из которых удалось выделить фаги. Так, из литических зон, появившихся на газоне культуры *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* штамма 3/3, после нанесения культуральной жидкости *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* шт. 837 было выделено 4 фага, различающихся по морфологии негативных колоний. Эти фаги были исследованы в электронном микроскопе, а также серологически.

По антигенным свойствам выделенные фаги распределялись в три группы, по морфологии своих частиц—в две.

К первой группе относился один фаг, который отличался оригинальностью структуры своих частиц. Частицы этого фага имели головку удлиненной формы размером около 700×500 А и короткий отросток длиной около 400—500 А. У основания отростка—пластинка, напоминающая воротничок с зубцами (рис. 1).

Остальные фаги идентичны по структуре своих частиц. Они имели головку гексагональной формы размером 500—550 А в диаметре и гибкий длинный отросток с несокращающимся чехлом. Длина отростка около 1800 А (рис. 2).

Как уже отмечалось нами, лизогенные культуры *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* в отличие от других разновидностей сравнительно легко образуют спонтанно и при воздействии ванкомицином вирулентные мутанты своих умеренных фагов. Далее нами было показано, что при нанесении на газон *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* фаголизата фага, специфичного только для культур *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus*, в ряде случаев возникают литические зоны. Было показано, что эти зоны вызваны не тем фагом, которым воздействовали, а вирулентными мутантами умеренных фагов культуры *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* [12]. При этом выделялся фаг, специфичный для *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus*, который по морфологии частиц был идентичен фагу с оригинальной структурой, показанной на рис. 1. Фаги с подобной структурой частиц выделялись нами при воздействии на культуру *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* ванкомицином. Частицы такой же морфологии наблюдались у вирулентных мутантов умеренных фагов *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*, возникающих спонтанно.

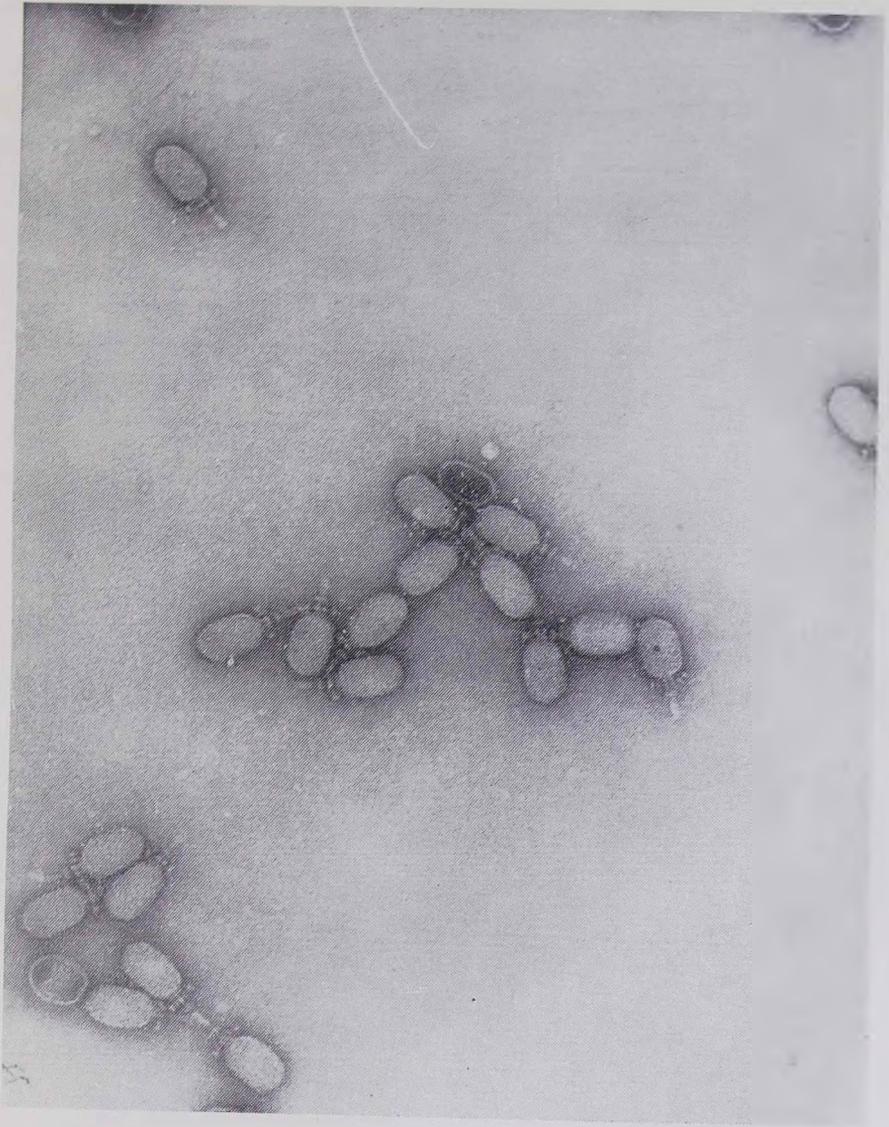


Рис. 1. Фаг культуры *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*. Увел. 150000.

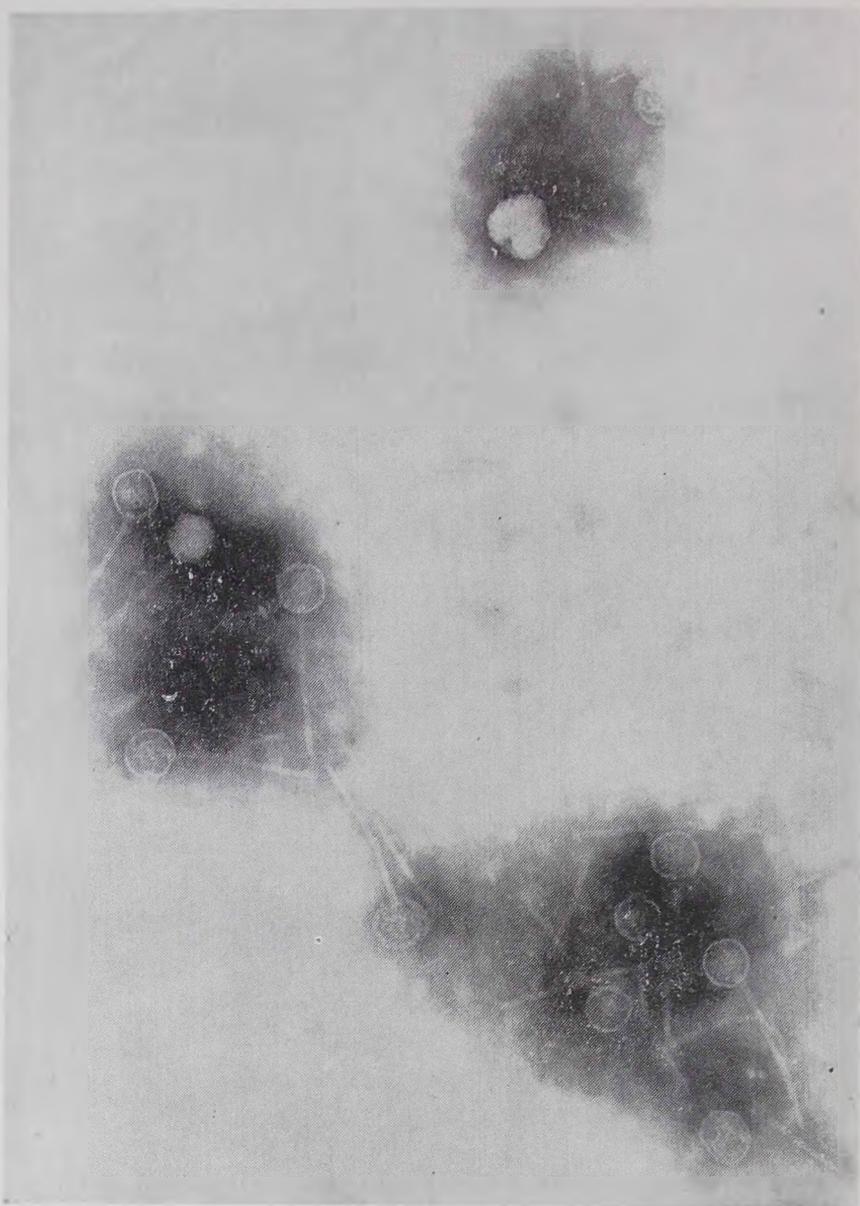
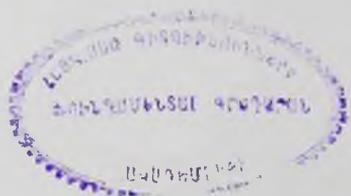


Рис. 2. Фаг культуры *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus*. Увел. 150000.



Вполне естественно, что перед нами возник вопрос, не являются ли фаги с оригинальной структурой частиц (рис. 1) вирулентным мутантом умеренного фага культуры *Bac. thuringiensis var. galleriae*, примененной в качестве индикаторной, а не умеренным фагом *Bac. thuringiensis var. caucasicus* 837.

Электронномикроскопическим исследованием было установлено, что в культуральных жидкостях *Bac. thuringiensis var. caucasicus* штаммов 805, 811, 837 обнаруживаются фаговые частицы, идентичные по своей морфологии фагу, показанному на рис. 2.

Важно отметить, что в культуральной жидкости всех исследуемых культур *Bac. thuringiensis var. caucasicus* ни разу не были обнаружены фаговые частицы с морфологией, свойственной фагам, содержащимся в лизогенных культурах *Bac. thuringiensis var. galleriae*.

Полученные данные показывают, что культуры *Bac. thuringiensis var. caucasicus* являются лизогенными.

Был проведен ряд опытов, направленных на выяснение возможности экспериментального получения вирулентных мутантов умеренных фагов культур *Bac. thuringiensis var. caucasicus*. С этой целью мы использовали акридин оранжевый и различные антибиотики (ванкомицин, брунеомицин, риентомицин и гентамицин). Однако вирулентных мутантов умеренных фагов из данных культур получить не удалось.

Следовательно, культуры *Bac. thuringiensis var. caucasicus* отличаются тем, что у них в лабораторных условиях не наблюдалось спонтанного образования вирулентных мутантов. Последние не возникали у этих культур при воздействии антибиотиком ванкомицином, вызывающим возникновение вирулентных мутантов фагов культур *Bac. thuringiensis var. galleriae*.

Следует иметь в виду, что при массовом размножении некоторых разновидностей вида *Bac. thuringiensis*, как, например, *Bac. thuringiensis var. dendrolimus*, у которых образование вирулентных мутантов фагов в лабораторных условиях наблюдалось очень редко, имел место фаголизис, вызванный вирулентными мутантами их умеренных фагов.

Поэтому вполне возможно, что это явление может иметь место и при массовом размножении культур *Bac. thuringiensis var. caucasicus*. Это обстоятельство следует иметь в виду в производстве инсектицидных препаратов из культур бактерий данной разновидности.

Не исключено также и то, что фаголизис этих культур в заводских условиях может быть вызван фагами, инфицировавшими культуру извне, т. е. происходящими из почвы. Наличие в некоторых почвах фагов, способных лизировать культуры *Bac. thuringiensis var. caucasicus*, нами неоднократно устанавливалось. Тем не менее полученные данные об особенностях культур *Bac. thuringiensis var. caucasicus* имеют большое теоретическое и практическое значение.

Во-первых, культуры этой разновидности могут быть успешно применены в борьбе с фаголизисом. Они должны быть включены в коллекцию заводских культур для использования их при необходимости заме-

ны одной культуры, чувствительной к определенному фагу, другой, устойчивой к нему (чередование культур).

Во-вторых, представленные данные показывают, что одним из эффективных методов борьбы с фаголизисом при производстве энтомопатогенных препаратов является селекция из природных источников активных культур, различающихся по биологии содержащихся в них фагов, а также по чувствительности к наиболее часто встречающимся на производстве фагам.

Несомненно, что в этом отношении природные ресурсы далеко не исчерпаны.

Институт микробиологии АН СССР, Москва

Поступило 17.V 1977 г.

BACILLUS THURINGIENSIS VAR. CAUCASICUS
ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ԶԳՍՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖԱԳԵՐԻ ԵՎ ԼԻՉՈԳԵՆԻԱՅԻ
ԵՐԵՎԱՆԻՅԹԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՎԵՐԱԲԵՐՅԱԼ

Յա. Ի. ՌԱՍԻՏԵՆՇԵՅՆ, Ն. Յա. ՍՈԼՈՎՅՈՎԱ, Տ. Բ. ԲԼՈԽԻՆԱ,
Լ. Ն. ՄՈՍԿԱԼԵՆԿՈ, Լ. Ս. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

Հաստատված է, որ ուսումնասիրված ենթատեսակի շտամները լաբորատոր պայմաններում չեն առաջացնում ֆագերի վիրուլենտ մուտանտներ, որն ընդգծում է այդ բակտերիաների մեծ հեռանկարները՝ նրանց հիման վրա ինսեկտիցիդային պրեպարատների արտադրության ուղղությամբ:

Ուսումնասիրված են մի շարք ֆագեր, որոնք ստացված են նշված տեսակի բակտերիաներից:

ON THE PECULIARITIES OF LYSOGENY AND SENSIBILITY
TO PHAGES OF CULTURES OF BACILLUS THURINGIENSIS
VAR. CAUCASICUS

Ya. I. RAUTENSHTEIN, N. Ya. SOLOVYEVA, T. B. BLOKHINA,
L. N. MOSKALENKO, L. S. KHACHATRIAN

Bac. thuringiensis var. *caucasicus* cultures do not produce of virulent phages of temperate ones and are perspective strains for bacterial insecticide production. Different phages from some serotypes of *Bac. thuringiensis* have been isolated and investigated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
2. Африкян Э. К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973.
3. Африкян Э. К., Чил-Акопян Л. А. ДАН АрмССР, 47, 4, 1968.
4. Африкян Э. К., Чилингарян В. А., Чил-Акопян Л. А., Туманян В. Г., Бобицян Р. А., Геворкян С. Г. Биолог. ж. Армении, 22, 8, 3, 1969.
5. Москаленко Л. Н., Раутенштейн Я. И. Микробиология, 33, 5, 489. 1969.
6. Паносян Л. Б. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1972.
7. Раутенштейн Я. И., Мисюрёва Н. Г., Хачатрян Л. С. Микробиология, 33, 980, 1964.

8. Раутенштейн Я. И., Соловьева Н. Я. Микробиология, 32, 2, 252, 1963.
9. Раутенштейн Я. И. Сельскохозяйственная биология, 4, 499, 1967.
10. Раутенштейн Я. И., Соловьева Н. Я., Круковская Г. Е., Блохина Т. П., Москаленко Л. Н., Филагова А. Д. Микробиология, 40, 3, 542, 1971.
11. Раутенштейн Я. И., Круковская Г. Е., Блохина Т. П., Соловьева Н. Я. Микробиология, 41, 1, 177, 1972.
12. Раутенштейн Я. И., Москаленко Л. Н., Маранц Л. Л., Блохина Т. П. Микробиология, 43, 4, 902, 1974.
13. Хачатрян Л. С., Раутенштейн Я. И. Микробиология, 32, 5, 813, 1963.
14. Хачатрян Л. С. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1966.
15. Швецова О. И. Сб.: Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. М., 1963.