

ФИТОПАТОЛОГИЯ

М. И. ГОЛЬДИН

I

О ВЛИЯНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ВИРУС МОЗАИКИ ТАБАКА

(Представлено академиком Н. И. Васильевым 31 VII 1938)

В распространении вирусов растений в природе большое место занимают почва и растительные остатки. Вопрос о перезимовывании вирусов в почве и в растительных остатках и о сохранении их в этой среде имеет большое практическое значение.

Хугган и Джонсон (1) экспериментально доказали, что «большая часть, если не все количество, вируса, находящегося в мертвой растительной ткани, выщелачивается в почву и таким образом распространяется на значительное расстояние». Очевидно, что дальнейшая судьба вируса, перешедшего в почвенный раствор, в значительной мере определяется характером биологических процессов в почве. Известно, что большинство фитопатогенных бактерий в нестерильной почве быстро погибает. Они не выдерживают конкуренции сапрофитов, кроме того поедаются простейшими. Так например, по нашим опытам культура *B. mori*, добавленная в количестве 5 млрд. на 100 г почвы в стерильных условиях, сохранялась более 2 месяцев, а в почве нестерильной погибала уже на 3—5-й день. *B. tumefaciens*, напротив, способна сохраняться в почве годами.

Для изучения вопроса о распространении вирусных заболеваний в природе весьма важно выяснить, в какие отношения могут вступать вирусы и микроорганизмы как в чистых культурах, так и в естественных условиях.

Детальное изучение характера влияния микроорганизмов на растительные вирусы может дать ценный материал и для суждения о природе вирусов.

С этой точки зрения различные физиологические группы микроорганизмов могут быть применены как своеобразные реактивы. Если в частности рассматривать согласно учению Stanley вирус мозаики табака как белок, то было бы весьма важно выяснить, какие микробы и при каких условиях способны этот белок разлагать.

Влияние микроорганизмов на сохраняемость вирусов в нестерильной среде может быть связано с целым рядом условий, существующих в почве.

Одним из наиболее важных факторов являются окислительно-восстановительные условия.

Вопрос о влиянии кислорода на растительные вирусы разработан недостаточно. Джонсон (2) вносил в почву мозаичный сок и сухие листья и затем через 2—4—5 месяцев заражал этой почвой растения. На основании этих опытов он пришел к выводу, что вирус мозаики табака может перезимовывать в почве и что в почвах, более увлажненных и хорошо аэрируемых, вирус инактивируется быстрее, чем в почвах сухих и плотных.

Нами были поставлены опыты по хранению вируса мозаики табака при температуре +25° в аэробных и анаэробных условиях (анаэробные условия осуществлялись с помощью щелочного раствора пирогаллола) с профильтрованным через фильтровальную бумагу соком мозаичных томатов и со стерильным фильтратом (профильтрован через свечи L 3). Титр вируса учитывался по методу Холмса путем заражения по 2—3 листа *Nicotiana glutinosa* на каждое разведение. Нами было проведено более 10 серий опытов. Ограничимся лишь некоторыми примерами (табл. 1).

Таблица 1
Изменение концентрации вируса мозаики табака при хранении в аэробных и анаэробных условиях при температуре +25°

Время опыта		Число некрозов на листьях <i>Nicotiana glutinosa</i> при разведении					
		Аэробное хранение			Анаэробное хранение		
		Неразведен.	1 : 10	1 : 100	Неразведен.	1 : 10	1 : 100
Вирусный сок (стерильный)	Опыт заложен 14 IV. Испытание 1 VII . . .	5, 2, 3	0, 0, 0	0, 0, 0	49, 62, 51	73, 56, 59	30, 31, 20
	Опыт заложен 27 V. Испытание 27 VI . . .	5, 2, 1	10, 16, 20	2, 0	22, 25	109, 90, 100	52, 57, 40
	Опыт заложен 5 VII. Испытание 28 XI . . .	17, 10, 7	1, 1, 3	—	42, 27, 35	33, 43, 49	—
	Опыт заложен 5 VII. Испытание 28 XI . . .	0, 0, 0	0, 0, 0	—	40, 19, 23	7, 2, 9	—
	Опыт заложен 26 VIII. Испытание 3 XII . . .	5, 1, 0	0, 0	—	41, 36, 53	2, 3, 10	—
Фильтрат вирусного сока (стерильный)							

Результаты этих опытов показали, что аэробные условия способствуют инактивации вируса, хранящегося не только в присутствии различных микроорганизмов, но и в стерильном фильтрате.

Обращает на себя внимание некоторая индивидуальность различных серий мозаичного сока в отношении сохраняемости их титра. Различные образцы мозаичного сока независимо от исходного титра сохраняют свою активность в различной степени. Одни теряют ее очень быстро в течение 1—1,5 месяца (даже при хранении на холоду); а другие остаются активными в течение года и больше. Таким образом различные образцы вирусного сока далеко не всегда могут быть сравниваемы друг с другом.

В 1926 г. Мульванием⁽³⁾ впервые были поставлены опыты по влиянию различных микроорганизмов на вирус мозаики табака. Им было поставлено всего 2 опыта, которые дали не совсем согласованные результаты. На основании этих двух опытов автор приходит к выводу, что все микроорганизмы в большей или меньшей степени инактивируют вирус.

Дуниным⁽⁴⁾ был обнаружен весьма интересный факт: согласно его опытам при хранении вируса мозаики табака в культуре *Macrosporium solani* последний «обуславливает очень резкие изменения в формообразовательных свойствах вируса мозаики табака».

Для более детального выяснения вопроса о влиянии микроорганизмов на вирус мозаики табака нами были поставлены опыты по хранению вируса в присутствии различных микроорганизмов. Исходным материалом нам служил сок мозаичных томатов, профильтрованный сначала через тонкий слой асбеста, а затем через свечу L 3. Опыт ставился в трех вариантах. Культура микроорганизмов засеивалась: а) в неразведенный фильтрат (рН=6.5—6.8); б) в раствор, состоящий из 2.7 см³ МП бульона (рН=7.2 и 6.0)+0.3 см³ фильтрата; в) в раствор, состоящий из 3 см³ фосфатов (рН=7.0)+1 см³ фильтрата. Все пробирки сохранялись во влажной камере при температуре 25°. В первых сериях опытов, поставленных по варианту «а» с *B. mycoides* (выделен из почвы из-под томатов, пораженных мозаикой), *B. coli* comm. и *Torula kefir*, мы получили резкое различие в поведении *B. mycoides* и *Torula kefir*.

В то время, как в культуре *Torula kefir* вирус инактивируется почти полностью уже на 2-й день, титр вируса, сохраняющегося в культуре *B. mycoides*, был не ниже контроля. *B. coli* comm. занимает промежуточное положение. Эти опыты были повторены многократно по всем трем вариантам и дали совершенно однородные результаты. Установив инактивирующее действие испытанного нами штамма *Torula kefir*, мы затем испытали ряд других дрожжей.

Как видно из табл. 2, различные микроорганизмы оказывают далеко не одинаковое влияние на вирус мозаики табака.

В присутствии *B. mycoides* вирус не только не инактивировался, но, напротив, в ряде случаев титр его оказывался несколько выше, чем в контроле. Также некоторое благоприятное действие оказывали культура *Shizocacch. Pombe*; *Sacch. cerev.*, розовые дрожжи и в особенности *Torula kefir* (штамм № 1) заметно инактивировали вирус в течение нескольких дней. Остальные испытанные нами микроорганизмы проявляли лишь весьма незначительное влияние на сохраняемость вируса мозаики табака*.

Каковы причины инактивирующего действия *Torula kefir* и других микроорганизмов? Проявляется ли оно непосредственно в процессе развития микроорганизма или же вирус инактивируется продуктами метаболизма? Периодический учет рН в культурах этих микроорганизмов показывает, что инактивирующее действие не обусловлено изменением концентрации рН.

Отметим, что инактивирующее действие *Torula kefir* проявлялось лишь в аэробных условиях. В анаэробных условиях вирус мозаики табака сохранял свой титр в культуре *Torula kefir* более месяца. Помимо вопроса о положительном или отрицательном влиянии микроорганизмов на вирус весьма интересным является следующий вопрос: если вирус мозаики табака есть белок, то может ли он использоваться гнилостными микробами? Первые серии опытов, поставленные с *B. coli* comm., *B. proteus vulgaris*, *B. prodigiosum*, *B. fluorescens liquifaciens*, показали, что эти микроорганизмы неспособны размножаться в среде, где единственным возможным источником энергии являлся «кристаллический» вирус Stanley. Титр вируса в этих культурах не отличался от контроля. В настоящее время эти опыты нами продолжаются.

В ы в о д ы. 1. Стерильный (фильтрат) и нестерильный вирусный сок в аэробных условиях инактивируются значительно скорее, чем в анаэробных условиях. 2. Далеко не все микроорганизмы, развиваясь в среде, содержащей вирус мозаики табака, инактивируют последний. Титр вируса мозаики табака, сохраняющегося более месяца в культуре *B. mycoides*, был

* В октябрьской тетради Phytopathology (1937 г.) была опубликована работа J. Johnson a. J. Hoggan. В этой работе авторами, как они утверждают, было установлено инактивирующее действие различных бактерий и грибов на вирус мозаики табака.

Изменение концентрации вируса мозаики табака при хранении в аэробных условиях в чистых культурах различных микроорганизмов при температуре +25° (среда МП бульон, рН=6.8)

Время опыта	Разведени я	Фильтрат				Наименование культур	Опыт заложен 27 V		
		Число некрозов на листьях					Неразведен.	1 : 10	
		Без куль- туры	+ <i>B. mycoi- des</i>	+ <i>B. coli</i> comm.	+ <i>To- rula kefiri</i>				
Испытание 8 VI	Неразв. 1 : 10 1 : 100	37, 22	46, 57	26, 20	1, 0	Фильтрат без культуры	29, 35, 26	19, 10, 12	
		9, 70 4	37, 20 4	13, 19 2	2, 3 0		» + <i>Hefe</i>	28, 47, 20	14, 16, 12
Испытание 15 VI	Неразв. 1 : 10 1 : 100	43, 46	62, 57	26, 21	0, 0	» + <i>Sacch. cerev.</i>	3, 1, 0	12, 10, 14	
		10, 23 8	32, 31 14	14, 10 1, 1	2, 1 0	» + <i>Torula kefiri</i>	3, 0, 3	2, 0, 1	
Испытание 19 VI	1 : 10 1 : 1000	32, 36	55, 35	23, 18	9, 6	» + <i>Shizosacch. Pombe</i>	37, 35, 31	9, 8, 5	
		14, 13 6, 3	14, 11 1, 1	6, 8 2, 2	0, 0 0, 0	» + <i>Debarm</i> var.	27, 22, 29	4, 8	
Испытание 29 VI	Неразв. 1 : 10 1 : 100	30, 32, 36	44, 48, 52	20, 17, 14	2, 10	» + <i>Sacchar. ellip.</i>	14, 10, 4	24, 37, 22	
		32, 33, 28	31, 29, 26	20, 17	0, 0, 0	» + <i>B. coli</i> comm.	10, 16, 15	4, 9, 10	
Испытание 29 VI	1 : 10 1 : 100	1, 8, 5	4, 7, 3	2, 3	0, 0	» + <i>B. mycoi- des</i> (штамм № 1)	21, 22, 18	34, 33, 39	
						» + <i>B. mycoi- des</i> (штамм № 2)	21, 22, 30	7, 3, 4	
						Опыт заложен 21 VI			
						Испыт. 25 VII		Испыт. 21 *	
						Неразв. 1 : 10		Разв. 1 : 10	
						19, 33, 50		10, 2	
						30, 45, 33		8, 14	
						45, 43, 40		3, 2	
						19, 33, 50		8, 5, 6	
						30, 45, 33		4, 5, 5	
						45, 43, 40		9, 7, 5	

* Испытание от 21 проведено по методу половиннок.

не ниже контроля. 3. Испытанные нами гниlostные микробы не разрушали «кристаллический» вирус мозаики табака.

Институт микробиологии.
Академия Наук СССР.

Поступило
31 VII 1938.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. Hoggan, J. Johnson, Journ. of Agricult. Research., 52, 4 (1936).
² J. Johnson, Science, 64 (1926). ³ M. Mulyani, Phytopath., 16 (1926).
⁴ М. Дуниин, Итоги научно-исследовательских работ Всесоюзного института защиты растений за 1935 г.

II

АДСОРБЦИЯ ВИРУСА МОЗАИКИ ТАБАКА МИКРООРГАНИЗМАМИ

(Представлено академиком Н. И. Вавиловым 31 VII 1938)

Вопрос об адсорбции вирусов человека и животных, а также бактериофагов различными микробами уже давно привлекает внимание исследователей.

В последнее время М. и Т. Ракитэн (1) был установлен весьма важный факт адсорбции и инактивации стафилококкового бактериофага бациллами, принадлежащими к группе *B. subtilis*. Что касается растительных вирусов, то здесь имеются данные лишь по адсорбции вирусов различными химическими веществами. Между тем вопрос об адсорбции растительных вирусов микробами может иметь большое значение, так как указывает на один из возможных путей в распространении вирусов в природе. Нами были поставлены опыты по адсорбции микробами вируса мозаики табака. Настоящая работа была проведена с соком томатов, пораженных вирусом мозаики табака, а также с «кристаллическим» вирусом мозаики табака, полученным от Stanley. Оба образца были предварительно профильтрованы через стерильную свечу L 3.

Техника опыта следующая: в пробирки, содержащие по 1 см³ фильтрата, добавлялось по 2 см³ фосфатной смеси различных значений рН (рН=5.3; 5.8; 7.3; 8.3). Затем в пробирки первого ряда (рН=5.3; 3.8; 7.3; 8.3) вносилось определенное количество культуры микроба (по стандарту 2—3 млрд.). Во второй ряд с теми же значениями рН вносился другой микроб и т. д. Последние четыре пробирки (рН=5.3; 5.8; 7.3; 8.3), в которые микробы не добавлялись, являлись контролем. Все пробирки оставались на 2 часа в термостате при 37°, а затем на сутки в холодильнике, после чего все смеси центрифугировались 5 мин. при 1 000 оборотах. Жидкость, полученная после центрифугирования, отсасывалась возможно полнее. На дне оставался лишь осадок, состоящий в основном из микробных тел. Затем в каждую пробирку вносилось по 2 см³ фосфатной смеси соответствующего рН. Центрифугирование и декантация повторялись 3—4 раза. Затем производился учет вируса в осадке и в последней промывной жидкости. Каждый осадок перед заражением смешивался с 1 см³ стерильной водопроводной воды (рН=6.8).

С контролем (фильтрат без добавки микробов) проводились те же манипуляции. На дне контрольной пробирки оставалось 0.1—0.2 см³ фильтрата. Учет титра производился по методу Холмса путем заражения *Nicotiana glutinosa* по 2—3 листа на каждое разведение.

Как видно из таблицы, вирус мозаики табака может быть адсорбирован *B. mycoides* и *Shizocacchar. Pombé*. Благоприятным условием адсорбции является кислая среда. В пробирках с фильтратом при внесении буферной смеси рН=8.3 выпадает хлопьевидный осадок, но как раз при этом значении рН адсорбции не происходит, что указывает на специфичность наблюдаемой нами адсорбции.

Адсорбция вируса мозаики табака микроорганизмами

Наименование культур	Опыт от 3 VIII (сок томатов, пораженных вирусом мозаики табака)							
	Концентрация вируса мозаики табака после 3-кратного центрифугирования (число некрозов на листьях <i>Nicotiana glutinosa</i>)							
	В промывных водах				В осадке			
	pH=5.3		pH=7.3		pH=5.3		pH=7.3	
	Не-разв.	1:10	Не-разв.	1:10	Не-разв.	1:10	Не-разв.	1:10
<i>B. mycoides</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	16,15,6	2,0,1	0,0	0,0
<i>Torula kefir</i> (штамм № 1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Shizocacch. Pombe</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	11,4,9	3,2,1	0,0	0,0
Контроль	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Опыт от 2 XI (вирус Stanley)							
<i>B. mycoides</i>	2,0	0,0	—	—	8,2	6,2	—	—
<i>Torula kefir</i> (штамм № 1)	0,0	0,0	—	—	0,0	0,0	—	—
<i>Shizocacch. Pombe</i>	0,0	0,0	—	—	2,0	2,1	—	—
Контроль	0,0	0,0	—	—	0,0	0,0	—	—
	Опыт от 26 X							
	pH=5.3	pH=5.8	pH=7.3	pH=8.3	pH=5.3	pH=5.8	pH=7.3	pH=8.3
<i>Shizocacch. Pombe</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. mycoides</i>	1,0	0,0	0,0	0,0	5,4	0,1	0,0	0,0
<i>Torula kefir</i> (штамм № 1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Torula kefir</i> (штамм № 2)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Sacchar. ellip.</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Розовые дрожжи	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Контроль	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Следует отметить, что адсорбентами оказались микробы, которые, как показали наши опыты (2), в отличие от ряда других микроорганизмов не способствовали инактивации вируса мозаики табака при совместном нахождении.

В дальнейшем необходимо изучить поведение вируса мозаики табака в адсорбированном состоянии (отношение к температуре, длительность сохранения, отношение к антисептикам и т. д.), а также выяснить возможность адсорбции вируса убитыми микробами. Эти опыты должны определить удельный вес наблюдаемого нами явления в распространении и сохранении вируса мозаики табака в естественных условиях в почве.

В о д ы. Вирус мозаики табака может быть адсорбирован микроорганизмами (*B. mycoides* и др.). Адсорбция происходит в кислой среде и носит избирательный характер.

Лаборатория вирусов растений.
Институт микробиологии.
Академия Наук СССР.

Поступило
31 VII 1938.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ M. Rakieten a. T. Rakieten, Journ. of Bact., 34, № 3 (1937). ² М. Гольдин, ДАН, XX, № 8, 733 (1938).