

МИКРОБИОЛОГИЯ

А. Е. КРИСС и Е. А. РУКИНА

БАКТЕРИОФАГ В МОРЕ

(Представлено академиком Б. Л. Исаченко 3 III 1947)

Вопрос о распространении бактериофагов в море не получил еще своего разрешения. Между тем он имеет значение для развития представлений об условиях жизнедеятельности микроорганизмов в морских водоемах. Бактериофаг принадлежит к числу мощных биологических факторов, определяющих формирование микробных биоценозов, и не только в силу лизирующего действия его на бактерии, но и благодаря способности вызывать наследственные изменения и отбор в бактериальных популяциях.

Еще Д'Эрелль⁽²⁾ пытался выделить бактериофаг из морской воды. Он нашел фаг к кишечной палочке в устье Меконга и в Средиземном море около Марселя, но в пробе воды, взятой в Индийском океане на большом расстоянии от берегов, ему не удалось обнаружить бактериофагов. После него многие исследователи^(3-5, 7 и др.) занимались поисками бактериофагов к синегнойной палочке, дизентерийной палочке, бактериям кишечного-тифозной группы в различных морях. Они находили их, главным образом, в портах, в устьях рек, в прибрежной полосе: повидимому, эти бактериофаги к патогенным формам микроорганизмов попадали в море с нечистотами и сточными водами. По мнению Д'Эрелля, „все, что когда-либо соприкасалось с животными испражнениями, должно содержать бактериофагов“. С другой стороны, Davis⁽⁶⁾ не смог определить наличия бактериофагов даже в загрязненных водах. Согласно наблюдениям Океанографического института Калифорнийского университета, удается констатировать в отдельных случаях присутствие бактериофага в морской воде вдоль побережья, но он ни разу не обнаруживался в пробах воды вне зоны литорали.

Таким образом, литературные данные позволяют заключить, что распространение бактериофагов в морских водоемах носит случайный характер; они иногда встречаются в береговой полосе или других местах, где возможно попадание в море сточных вод, содержащих фекальные загрязнения. По своему составу эти бактериофаги в основном относятся к числу фагов, действующих на кишечного-тифозную группу бактерий. С экологической стороны представляло большой интерес выяснить распространение в море бактериофагов к морским формам бактерий. Этому и были посвящены приводимые в настоящей статье исследования.

В сентябре 1946 г. комплексная Океанографическая экспедиция по изучению Черного моря, в которой мы принимали участие, сделала разрез Ялта—Батуми. Этот разрез, пересекающий центральную и восточную части Черного моря, прошел через участки моря, наиболее удаленные от берегов, с максимальными глубинами. На 5 станциях по разрезу, на расстоянии 30 миль друг от друга, были взяты пробы

воды, а на 4 — и образцы грунта. Глубина первой станции 2240 м, второй — 2164 м, третьей — 2150 м, четвертой — 2100 м, пятой — 1730 м.

Пробы воды до глубины 250 м извлекались по горизонтам: 1, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 м. Начиная с 250 м, пробы воды брались по горизонтам: 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 м. Забор образцов грунта производился на 2-й, 3-й, 4-й, 5-й станциях трубкой Экмана — исследовались только поверхностные слои илов. Каждая проба воды и илов высевалась на рыбо-пептонный агар, приготовленный на морской воде, для выделения бактериальных видов, встречающихся на данной глубине. Различающиеся колонии, которые вырастали на агаре, отбирались в пробирки со скошенным агаром и составили, таким образом, коллекцию культур микроорганизмов, характеризующую бактериальное население на различных глубинах в исследованных районах Черного моря.

Для определения присутствия бактериофага в морской воде и илах все пробы были разделены на 4 группы. В первую группу вошли пробы воды из горизонтов 1, 25, 50, 75, 100 м; во вторую — из горизонтов 125, 150, 175, 200, 225, 250 м; в третью — из горизонтов 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000 м, взятые на всех пяти станциях. 4-я группа состояла из образцов поверхностного слоя грунтов, полученных со 2-й, 3-й, 4-й и 5-й станций. В пределах каждой группы пробы воды смешивались по 3 мл, а образцы илов по 2 г. Соединенные вместе с пяти станций пробы воды первой группы, в количестве 75 мл, составили среднюю пробу воды из слоя от 1 до 100 м глубины; второй группы, в количестве 90 мл, — среднюю пробу из слоя от 125 до 250 м глубины; третьей группы, в количестве 100 мл, — из слоя от 500 до 2000 м глубины. Смешанные образцы грунтов представляли собой средний образец ила 4 станций.

Обнаружение бактериофага. а) Прямой метод. Средние пробы воды из слоев 1 — 100 м, 125 — 250 м, 500 — 2000 м и средний образец ила разбавлялись 100 мл рыбо-пептонного бульона для того, чтобы воспрепятствовать адсорбции фага на асбестовых пластинках, и тотчас же профильтровывались в приборах Зейтца.

б) Метод „подсева“. Этот метод, основанный на принципе усиления бактериофага при лизисе гомологичных бактерий, применялся в следующем виде. В пробирки с 3 мл мясо-пептонного бульона прибавлялись 1 мл воды средней пробы данного слоя или 1 мл суспензии среднего образца ила и петля соответствующей бульонной культуры, 18 — 20-часового возраста, выделенной из воды или ила. После выдерживания в термостате при 25° в течение 18 — 22 часов, содержимое пробирок по каждому слою в отдельности смешивалось и фильтровалось в приборах Зейтца.

в) Метод „пассажа“. В целях дальнейшего усиления литического действия фильтратов, полученных методом подсева, они пассивировались на тех же бактериальных культурах. Пассаж производился по вышеописанной методике, но только вместо воды или суспензии ила к бульону, засеянному гомологичной культурой, добавлялся 1 мл фильтрата.

Литическое действие фильтратов, полученных прямым методом и методами подсева и пассажа, испытывалось на культурах бактерий, выделенных на различных горизонтах, откуда брались пробы воды, и из илов. Общее число культур, служивших тест-объектами, равнялось 143. Для испытаний применялись бульонные культуры 18 — 20-часового возраста. Большая капля такой бульонной культуры распределялась полосой на поверхности мясо-пептонного агара. Фильтрат или стерильный бульон (в контрольной чашке) наносился капелькой в центр полосы. Параллельно применялся другой способ: к охлажден-

ному, но еще не застывшему агару в чашке Петри прибавлялось 2 мл фильтрата. После застывания этой смеси по поверхности засеивалась сплошным слоем бульонная культура. Во всех опытах мясо-пептонный бульон и агар готовились с прибавлением 1,8% NaCl.

Таблица 1

Бактериофаги в воде и илах Черного моря

Средняя проба слоя в м	№№ культур	Станция и горизонт выделения культур	Метод выявления фага	Характер роста культур		
				в месте нанесения капли фильтрата	на агаре, смешанном с фильтратом	в контрольной чашке
1—100	66	III ст. 50 м	прямой	t. vierges	t. vierges	t. vierges
	43	II ст. 225 м	подсев	t. v.	норм.	норм.
125—250	114	V ст. 125 м	прямой подсев пассаж (1) » (2)	норм. слабый рост норм. t. v.	слабый рост » норм. зоны лизиса	норм. » » »
	121	V ст. 225 м	прямой подсев пассаж (1)	норм. t. v. зона лизиса	норм. слабый рост зона лизиса	норм. t. v. »
500—2000	102	IV ст. 1250 м	прямой подсев	норм. t. v.	норм. зоны лизиса	норм. »
	111	V ст. 125 м	подсев	зона лизиса	t. v.	норм.
	55	II ст. 1750 м	прямой	t. v.	t. v.	t. v.
	1016	IV ст. 1000 м	прямой подсев пассаж (1) » (2)	истонч. рост норм. » »	слабый рост норм. » »	норм. » » »
ил	143	V ст. ил	прямой подсев пассаж (1) » (2) » (3) » (4)	норм. истонч. рост слабый рост t. v. истонч. рост зона лизиса	норм. слабый рост » » » t. v.	норм. » » » » »
	94	IV ст. 175 м	подсев	t. v.	t. v.	норм.
	87	IV ст. ил	прямой	t. v.	слабый рост	t. v.

Опытные и контрольные чашки выдерживались в термостате при 25° С 20—24 часа, а затем регистрировались результаты.

Из-за ограниченности места, в таблице приведена лишь небольшая часть фактического материала. Выборочно приведенные данные дают представление о всех вариациях в действии фильтратов, которые выявились в процессе исследований (табл. 1).

Прямым методом бактериофаг был обнаружен в редких случаях. Значительно чаще он выявлялся методом подсева. С помощью этого метода удалось определить присутствие бактериофага на больших глубинах, в сероводородной зоне Черного моря и в грунтах. Действие

фильтратов сказывалось в появлении типичных *taches vierges* на бактериальных культурах, а в отдельных случаях наблюдались и значительные участки лизиса. Пассажи обычно усиливали литическую силу фильтратов: число *taches vierges* увеличивалось или вместо очень мелких стерильных пятен — негативных колоний — появлялись зоны лизиса, края культуры приобретали изъеденный, кружевной вид. Бактериофагия часто наблюдалась не только на агаровых средах, но и в засеянном культурой бульоне, к которому добавлялся фильтрат, полученный методами подсева или пассажа. Она проявлялась в виде характерной аглютинации культуры, или о ней можно было судить в первые 6 часов наблюдений по отсутствию мути или меньшей мути в бульоне по сравнению с контрольной пробиркой, которая засеивалась той же культурой без добавления фильтрата. В круг морских форм бактерий, лизируемых бактериофагами из воды и илов Черного моря, входили кокки, неспороносные подвижные и неподвижные палочки и споросные виды.

Перекрестные определения показали, что некоторые культуры, выделенные с определенных горизонтов, могут лизироваться фильтратами, полученными из самых различных слоев воды, а также из ила. В качестве примера приведены культуры №№ 43, 111, 94. К ним были найдены бактериофаги не только в слое воды 125—250 м, но и в слоях 1—100 м, 500—2000 м и в илах — обстоятельство, указывающее на широкое распространение этих бактериофагов в толще воды и в грунтах Черного моря.

Заслуживают внимания также следующие факты. Полосы культур №№ 66, 121, 55, 87 в контрольной чашке, не подвергавшиеся действию фильтратов, были покрыты множеством *taches vierges*. Культуры были явно „заражены“ бактериофагом или продуцировали его, т. е. принадлежали к числу так называемых лизогенных культур. Такие бактериальные формы были нередки. Они выделены с различных глубин и из илов.

Бактерицидные свойства морской воды, о которых имеются в литературе сообщения (¹, ⁸) и др.), повидимому, определяются не только наличием бактериофага, но и другими факторами. Картины, подобные тем, какие наблюдались в опытах с культурой № 1016, когда фильтрат морской воды оказывал задерживающее влияние на бактериальный рост, встречались сравнительно часто. Против явления бактериофагии в этих случаях говорит то, что фильтраты, полученные методами подсева и пассажа, не вызывали никаких изменений в росте культур. Бактериофаги, выявленные в воде и илах Черного моря, не обладали большой литической силой, если судить по числу и величине *taches vierges*. С другой стороны, необходимо считаться с тем, что полученные из проб воды и грунтов культуры бактерий, служившие тест-объектами, возможно, представляют собой популяции, состоящие в значительной своей массе из лизорезистентных клеток.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР

Поступило
3 III 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Красильников, Микробиология, 7, 329 (1938). ² Ф. Д'Эрелль, Бактериофаг и его значение для иммунитета, М.—Л., 1926. ³ F. Arloing et Sempé, C. R. Soc. Biol., 94, 191, 428 (1926). ⁴ H. Morin et J. Guillermin, *ibid.*, 98, 575 (1928). ⁵ I. Ascheschova, *ibid.*, 95, 1029 (1926). ⁶ B. Davis, J. Roy. Army Med. Corps, 61, 18 (1933), цитир. по C. ZoBell, Marine Microbiology. ⁷ B. Fejgin, G. R. Soc. Biol., 95, 659 (1926). ⁸ C. ZoBell, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 34, 313 (1936); Marine Microbiology, A Monograph on Hydrobacteriology, Mass., USA, 1946.