

Э.К.Африкан, З.Г.Авакян, Р.А.Бобикян,
К.О.Чилингарян, С.Н.Багдасарян

ВИТАМИННЫЕ И АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОТРЕБНОСТИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

В литературе имеется немало работ о наличии в группе спорообразующих бактерий культур, зависящих от различных аминокислот и витаминов (Иерусалимский, 1949; Мейсель, 1950; Найденова, 1964; Логина и др., 1966; Allan, 1953; Reusser et al., 1957; Koser, 1968).

Ранее сложившийся взгляд, что непатогенные микроорганизмы не нуждаются в дополнительных ростовых факторах, в свое время послужил основой для заключений о незначительной роли витаминов и отчасти аминокислот в жизнедеятельности большинства видов аэробных спорообразующих бактерий. Группа анаэробных спорообразующих бактерий, особенно патогенные формы, включает большое разнообразие видов со сложным комплексом зависимости от многих витаминов, аминокислот и других существенно важных ростовых соединений. Витаминная и аминокислотная зависимость была установлена для многих термофильных (Найденова, 1964; Логина и др., 1966; Allen, 1953) и психрофильных (Adams, Stokes, 1968) видов. По лизофильным формам аэробных спорообразующих бактерий имелись отрывочные сведения о витаминной потребности отдельных культур. Единственное исследование по этому вопросу, проведенное Найтом и Прумом (Knight, Proom, 1950; Proom, Knight, 1955), объектом изучения имело коллекционные культуры нескольких видов.

Сравнительно хорошо изученным в этом отношении является сибиреязвенный бацилл, однако полученные результаты противоречивы. Ранние исследования (Gladstone, 1939) показали, что потребности в аминокислотах у разных штаммов *Bac. anthracis* различны, и их нельзя использовать для дифференциации культур данного вида от *Bac. cereus*. Подобный взгляд поддерживался и другими авторами (Brewer et al., 1946), которые выявили витаминную зависимость штамма *Bac. anthracis*. Это было подтверждено по отношению к другим шести культурам (Proom, Knight, 1955), и в настоящее время специальные среды для культивирования сибиреязвенного бацилла вос-

да содержат тиамин (Pearce, Powell, 1951).

Хорошо установленным является более выраженная витаминная и аминокислотная зависимость термофильных форм мезофильных видов спороносных бактерий (Логинов и др., 1966). Так, Бхат и Билимория (Bhat, Bilimoria, 1955) выделили 80 культур *Bac.coagulans*, *Bac.subtilis*, *Bac.sphaericus*, *Bac.brevis*, *Bac.firmus*, *Bac.megaterium*, развивавшихся при 55°, для которых характерной особенностью являлась зависимость от биотина, тиамина и никотиновой кислоты.

Энтомопатогенные виды спорообразующих бактерий характеризуются отличительными особенностями витаминного и аминокислотного питания. Культуры *Bac.papilliae*, *Bac.lentimorbus* специфически зависят от тиамина и требуют для своего вегетативного роста на искусственных средах внесения биотина, барбитуровой кислоты, триптофана и более десяти аминокислот (Sylvester, Costilow, 1964). Процесс образования спор и энтомоцидных токсинов у этих бактерий требует более сложного комплекса питательных факторов, до настоящего времени не идентифицированных (Steinkraus, Providenti, 1958; Rhodes, 1965; Costilow et al., 1966). Аналогичная характеристика может быть дана и *Bac.larvae*. Ряд авторов (Lochhead, 1942; Katznelson, Lochhead, 1947) установил специфическую зависимость культур этого вида от тиамина, предложив для выращивания их морковный сок. По нашим данным, для типичных культур *Bac.larvae* строго обязательным является использование сред, содержащих яичный желток. Это было нами установлено с патогенными штаммами данного вида — *saitana*, *paradeau*, *dubosque* — мы не смогли добиться культивирования их на экстрактах моркови и других растительных субстратах, а также на средах с лошадиной сывороткой.

Установлена тиаминная зависимость культур *Bac.alvei*, а также близкородственного ему *Bac.paraalvei* (Katznelson, Lochhead, 1947), по другим данным также и от биотина (Knight, Proom, 1950). Наряду с витаминами эти культуры для своего развития нуждались и во многих аминокислотах. Любопытно, что для витаминзависимых культур *Bac.alvei* наличие в среде тиазола может заменить целую молекулу тиамина.

В литературе не имеется данных о витаминном питании *Bac.*

thuringiensis. Единственное указание о трех штаммах этого вида имеется у Прума и Найта (Proom, Knight, 1955). Авторы не смогли выявить какой-либо зависимости испытанных культур от витаминов группы В. Подобное ими было установлено и на материале 13 штаммов *Bac.cereus* и 10 культур *Bac.mycoides*, все указанные бактерии не нуждались в витаминах, но требовали наличия в среде аминокислот (Knight, Proom, 1950). В литературе имеется указание о выделении штамма *Bac.mycoides*, нуждающегося в биотине (Smith et al., 1952).

Из изложенного явствует, что наиболее важными витаминами для аэробных спорообразующих бактерий являются тиамин и биотин, обнаруживается также и потребность отдельных видов, точнее культур, в никотиновой, фолиевой и пантотеновой кислотах, иногда в витамине В₁₂. Учитывая ряд исключений, вызванный использованием неправильно идентифицированных штаммов, данные литературы позволяют заключить, что особенности витаминного и аминокислотного питания могут служить дополнительным критерием для видовой характеристики некоторых видов спороносных бактерий.

Анаэробные спорообразующие бактерии, как известно, характеризуются более сложными потребностями витаминного и аминокислотного питания (Koser, 1968). Особенно часто обнаруживаются биотинзависимые штаммы, потребность в тиамине устанавливается редко. Многие виды нуждаются в наличии никотиновой, пантотеновой, фолиевой и парааминобензойной кислотах, а также в рибофлавине, пиридоксине. Анаэробные формы требуют для своего роста присутствия ряда аминокислот, пуринов, пиримидинов и других ростовых соединений.

В наших исследованиях ставилась цель дать качественную характеристику потребности различных видов энтомопатогенных спорообразующих бактерий группы *Bac.cereus-thuringiensis* в витаминах группы В и аминокислотах. В работе использовались как оригинальные, так и коллекционные культуры. Опыты проводились на агаризованных средах, а в дальнейшем и на жидких средах.

Ростовое и угнетающее действие этих соединений изучалось ауконографическим методом с применением дисков из хроматографической бумаги, импрегнированных различными ростовыми веществами. Диски раскладывались на поверхности агаризованных сред, диффузно засеянных однодневными культурами бактерий. Результаты опы-

тов учитывались спустя 24 и 48 часов. В работе использовались среды следующего состава:

<u>Среда ОСА</u>		<u>Среда СНЗ</u>	
K_2HPO_4	- 7,0 г	K_2HPO_4	- 5,0 г
KH_2PO_4	- 3,0 г	KH_2PO_4	- 5,0 г
$MgSO_4$	- 0,1 г	$MgSO_4$	- 0,05 г
$(NH_4)_2SO_4$	- 1,0 г	$MnSO_4 \cdot H_2O$	- 0,03 г
$NaCl$	- 0,5 г	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	- 0,01 г
Глюкоза	- 2,0 г	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	- 0,05 г
Дистил. вода	- до 1 литра	$NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	- 1,5 г
		Глюкоза	- 2,0 г
		Дистил. вода	- до 1 л.

Среды стерилизовались при 0,5 атм. 20 мин., конечный pH 7,2-7,4. В среды добавлялся 1% Дифко-агара, очищенного от аминокислот и витаминов. Суспензия испытуемых бактерий вносилась с расчетом конечного титра в пределах 100 тыс. кл./мл. Бумажные диски смачивались как отдельными, так и смесями аминокислот. В первом случае применялась конечная концентрация на 1 диск, равная 3×10^{-4} М каждой аминокислоты. В работе были испытаны отдельно L и D формы аминокислот аналитической чистоты (фирмы Sigma, Biochem.).

Смеси аминокислот в конечной концентрации 100-200 мкг на 1 диск использовались в следующих комбинациях, именуемых нами как группы:

<u>Группа I</u>	<u>Группа II</u>	<u>Группа III</u>
L - аланин	L - треонин	DL - лейцин
DL - серин	L - гистидин	L - изолейцин
L - пролин	L - глутаминовая кислота	L - валин
	DL - аспаратиновая кислота	
	L - пролин	

Группа IV	Группа V	Группа VI
L - триптофан	DL - лизин	DL - норлейцин
L - тирозин	L - аргинин	DL - норвалин
L - фенилаланин	DL - метионин	L - цистеин
Группа VII	Группа VIII	
DL - треонин	DL - орнитин	
DL - метионин	DL - аланин	
	DL - серин	

Витамины группы В применялись в концентрациях (мкг/бум. диск): тиамин - 4,0; рибофлавин, пантотенат кальция, пиридоксин, никотиновая кислота - по 10,0; парааминобензойная, фолиевая кислоты, биотин - по 1,0; инозит, холин - по 200,0; витамин B₁₂-0,1. Пурин- и пиримидиновые основания - аденин, гуанин, урацил, ксантин использовались в количестве 10 мкг на 1 диск.

Изучение витаминно- и аминокислотопотребных свойств спорообразующих бактерий проводилось в несколько этапов. Вначале определялась зависимость испытываемых культур от смеси витаминов и аминокислот. В этом случае использовались комплексы всех витаминов группы В, гидролизат казеина и их смесь. На втором этапе выявлялась потребность от отдельных витаминов, аминокислот и их смесей. Витамины применялись как в отдельности, так и в виде полного комплекса с исключением одного из витаминов. Наконец, на последнем этапе, с использованием жидких сред, уточнялись данные, полученные ауконографическим методом.

Как показали наши исследования, наиболее выраженной зависимостью от витаминов и аминокислот среди изученных разновидностей *Bac. thuringiensis* характеризуются культуры серотипа *berliner* (табл. I). Весьма специфической следует считать зависимость культур данного серотипа от тиамина. Штамм 647, выделенный нами из павшего тутового шелкопряда и являющийся активным продуцентом термостабильного энтомоцидного токсина, стимулировался в своем росте при внесении в среду рибофлавина и витамина B₁₂. Ростовыми факторами для культур данного серотипа являлись аргинин, метионин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты и некоторые другие, в зависимости от испытываемого штамма. Вегета-

Таблица I
Ростовые аминокислоты и витамины культур серотипа berliner Bac. thuringiensis

№ штаммов	Аминокислоты	Витамины
647	<u>арг</u> , <u>глю</u> , <u>про</u> , <u>мет</u> , <u>лей</u> , <u>гр. I</u> , <u>гр. II</u> <u>гр. III</u> , <u>гр. V</u> , <u>гр. VII</u> , <u>гр. VIII</u>	Тиамин, рибофлавин, витамины B ₁₂
728	<u>вал</u> , <u>глю</u> , <u>мет</u> , <u>тре</u> , <u>гр. I</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. V</u> , <u>гр. VII</u> <u>ала</u> , <u>арг</u> , <u>гис</u> , <u>вал</u> , <u>глю</u> , <u>мет</u> , <u>тре</u> , <u>глиц</u> , <u>вал</u> , <u>гр. I</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. V</u> , <u>гр. VII</u> , <u>гр. VIII</u>	Тиамин "-
729, 731, 734, 737, 739, 740, 748, 1013, 1025, 1028	<u>арг</u> , <u>асп</u> , <u>глю</u> , <u>гли</u> , <u>гр. I</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. V</u> <u>асп</u> , <u>гр. I</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. V</u> , <u>гр. VII</u> , <u>гр. VIII</u>	"- "- "- "-
735	<u>мет</u> , <u>гр. V</u> , <u>гр. VII</u>	"-
736		
745		

Примечание: В данной и последующих таблицах наиболее выраженные
ростовые факторы подчеркнуты.

тивный рост этих культур угнетался серином, изолейцином, треонином, а в отдельных случаях — пролином. Поскольку рост бактерий стимулировался гидролизатом казеина и некоторыми смесями аминокислот, то, очевидно, что угнетающее действие указанных аминокислот снижается под влиянием других. Необходимо подчеркнуть, что угнетение вегетативного роста изолейцином и серином отмечалось нами с культурами других серотипов *Bac. thuringiensis* а также штаммов *Bac. cereus*.

С использованием отдельных культур нами было изучено снятие угнетающего действия некоторых аминокислот под действием других. Так, было установлено, что для культуры 647 серотипа *berlinensis* угнетающее действие изолейцина снимают валин, метионин и лейцин, угнетение роста серином — глутаминовой и аспарагиновой кислотами, а угнетение треонином исключается под влиянием аланина, валина, триптофана, метионина.

Культуры серотипа *alesti* не обнаруживают выраженной зависимости от витаминов, таковая устанавливается у некоторых штаммов по отношению к биотину (табл. 2). Ростовое действие аминокислот выявляется в основном от аргинина и гистидина. Изученные нами 5 культур *Bac. cereus*, серотипируемых с сывороткой *alesti*, характеризуются более выраженной аминокислотной зависимостью, но отсутствием потребности к витаминам. Культуры серотипа *sotodendrolimus* в своем вегетативном росте интенсивно стимулируются под действием многих аминокислот как в отдельности, так и в смеси. Отдельные штаммы нуждаются в тиаминах, биотине и фолиевой кислоте (табл. 3).

Для культур серотипа *galleriae* исключительно характерным является выраженная зависимость одновременно от никотиновой кислоты и ряда аминокислот (табл. 4). Указанные в таблице ростовые аминокислоты должны трактоваться как существенно важные факторы роста при совместном использовании с никотиновой кислотой. Как правило, штаммы данного серотипа требуют комплекса аминокислот совместно с никотиновой кислотой, однако с указанным витамином отмечается удовлетворительный рост при использовании гистидина, аргинина, глутаминовой кислоты, метионина. Как показывают данные таблицы, два серотипируемых с сывороткой *galleriae* штамма *Bac. cereus* не характеризуются зависимостью от никотиновой кислоты. Отмеченная характеристика штаммов серотипа *galleriae*, по наше-

Таблица 2
Ростовые аминокислоты и витамины культур *Bac. thuringiensis* серотипа *alesti*
и *Bac. cereus*, серотипируемых с сывороткой *alesti*

№ штамма	Аминокислоты	Витамины
<i>Bac. thuringiensis</i> 741, 1020	<u>арг</u> , <u>гр. I</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. V</u>	<u>Биотин</u>
744	<u>асп</u> , <u>мет</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. VII</u>	
743, 890	<u>гр. II</u>	
1021	<u>гис</u> , <u>арг</u>	
<i>Bac. cereus</i> 683, 1048	<u>арг</u> , <u>асп</u> , <u>гли</u> , <u>глю+тре+лей</u> , <u>гр. I</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. V</u> , <u>гр. VII</u> , <u>гр. VIII</u>	<u>Биотин</u>
710	<u>гис</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. VIII</u>	
1012	<u>арг</u> , <u>асп</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. V</u> , <u>гр. VII</u> , <u>гр. VIII</u>	
1049	<u>гли</u> , <u>гр. I</u> , <u>гр. II</u> , <u>гр. VII</u> , <u>гр. VIII</u>	

Таблица 3

Ростовые аминокислоты и витамины для культур *Bac. thuringiensis* var.
soito-dendrolimus и серотипируемых с сывороткой sotto
штаммов *Bac. cereus*

штаммов	АМИНОКИСЛОТЫ	Витамины
<i>Bac. thuringiensis</i> 784, 1001	арг., асп, глут, тре, гис, гр. П, гр. У, гр. УП, гр. УШ	
898	- " -	Фолиевая к-та, биотин
1002, 1010, 1023 1024, 1039	- " -	Тиамин, биотин
1006, 1029	тре, лей, гр. П, гр. IV	
<i>Bac. cereus</i> 627	гидр. казеина	
657, 690, 769	асп, глут, мет, гис, арг, гр. I, гр. УП, гр. УШ	
793, 1050	тре + лей	
682, 938	асп, глут, гис	

Таблица 4

Ростовые аминокислоты и витамины культур *Bac. thuringiensis*
var. galleriae и *Bac. cereus*, серотипируемых с сывороткой *gal-
leriae*

№ штаммов	Аминокислоты	Витамины
<i>Bac. thuringiensis</i> 818, 821, 845, 846, 857	гис, глут, гр.П, гр.Ш, гр.УШ	Никотиновая кислота, совместно с аминокислотами
820, 829	гис, ала, гр.І, гр.П, гр.Ш, гр.УШ	" "
883	арг, глут, гис	" "
904, 906, 1000, 1005, 1011, 1027	гидр.казеина, гист+арг, гр.УШ	" "
<i>Bac. cereus</i> 601	асп, глут, гр.П, гр.ІУ, гр.УШ	Зависимости нет
1047	ала, гис, гр.І, гр.П, гр.У, гр.УШ	" "

му мнению, является отличительной особенностью культур кристаллофоров данной разновидности и должна учитываться в работах по производству энтобактерина.

Культуры описанного нами нового серотипа *saucasicus*, являющиеся сравнительно фагоустойчивыми и трудно лизогенными, не обнаруживают зависимости от витаминов группы В (табл. 5). Наиболее важными дополнительными факторами роста этих бактерий являются аминокислоты, главным образом, — гистидин, аргинин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Особенно выраженным их ростовое действие является при совместном использовании смеси аминокислот. Среди аминокислот, проявляющих ингибиторное действие, вновь выделяются изолейцин и серин.

Таблица 5

Ростовые аминокислоты для
культуры *Bac. thuringiensis var. saucasicus*

№ штаммов	Аминокислоты
805, 8II, 83I, 837, 839, 84I, 844	асп, <u>гис</u> , <u>глу</u> , мет, гр. II
879	Гидролиз. казеина
884, 889, 89I	арг, гис, глу, тре, гр. II
9II	Гидр. казеина, гр. II
927, 928, 939, 957	<u>гис</u> , тре, гр. II, гр. УП, гр. УШ

Среди изученных нами других серотипов культур кристаллофоров, представленных единичными штаммами — *entomocidus*, *tolworth*, *morrisoni*, *aizawa*, *kenyae*, *fowleri* — витаминной зависимостью характеризовалась лишь культура *Bac. thuringiensis var. kenyae* (потребность в тиамине). Все эти культуры оказались аминокислотнопотребными.

В нашей коллекции оригинальных штаммов имелась 2I культура кристаллофоров, которые не серотипировались ни с одной из агглютинирующих сывороток, известных разновидностей *Bac. thuringiensis*.

Эти штаммы, выделенные из разных насекомых преимущественно из тутового шелкопряда, по-видимому, являются представителями новых серотипов *Bac. thuringiensis* и в настоящее время всесторонне изучаются в нашей лаборатории. Все отмеченные культуры яв-

лялись аминокислотнопотребными, принципиально не отличаясь в этом отношении от других разновидностей *Bac. thuringiensis*. Среди них 5 штаммов оказались зависимыми от тиамина, I - от биотина, по одному - от никотиновой и парааминобензойной кислот.

Из исследованных нами 8 культур несеротипируемых некрис-таллофоров энтомогенного и неэнтомогенного происхождения, т.е. представителей типичного *Bac. cereus*, лишь один штамм оказался зависимым от витаминов (тиамин). Для всех других ростовыми факторами являлись аминокислоты, главным образом аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аргинин.

В таблице 6 представлены сводные данные о характеристике изученных нами культур группы *Bac. cereus-thuringiensis* по аминокислотному и витаминному питанию (для вегетативного размножения). Существенно важные ростовые факторы подчеркнуты, ряд аминокислот, в частности валин, проявляющий стимулирующее действие, не отмечен. Как видно из представленных данных, наиболее важные в производственном отношении серотипы (*berliner*, *galleriae*, *sotto-dendrolimae*) нуждаются для своего роста в присутствии тиамина, никотиновой кислоты и отчасти в биотине. Культур серотипа *saucaensis* характеризуются аминокислотной зависимостью.

Изложенный в данном разделе фактический материал показывает, что среди культур одного и того же серотипа *Bac. thuringiensis*

отмечаются определенные отличия по аукогетеротрофии, особенно по аминокислотному питанию. Значительных штаммовых различий в витаминном питании не выявляется.

В этом отношении для отдельных серотипов витаминная зависимость может быть полезным дополнительным признаком при идентификации. К таковым следует отнести тиаминовую зависимость культур серотипа *berliner* и потребность в никотиновой кислоте для представителей серотипа *galleriae*.

Избирательный характер аминокислотного питания культур кристаллофоров нами объясняется спецификой их биосинтетической активности по образованию энтомоцидных токсинов. Такие аминокислоты, как аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аргинин и гистидин, являющиеся наиболее преимущественными ростовыми факторами для культур *Bac. thuringiensis* являются наиболее преобладающими

ми формами аминокислот в составе продуцируемых энтомоцидных кристаллов. Специфика витаминного питания и более избирательный характер отношения к аминокислотам рассматривается нами как выражение эволюции энтомопатогенных форм *Bac. thuringiensis* из сапрофитов *Bac. cereus* (Африкян, 1970).

Ряд перспективных культур кристаллофоров был нами изучен более подробно. В таблице 7 представлены данные по таким штаммам серотипов *galleriae*, *berliner*. Культура № 1000 - источник получения препарата энтобактерин - 3, штаммы 647, 829 - выделенные в нашей лаборатории сравнительно устойчивые культуры *Bac. thuringiensis*. Как видно из приведенных данных, вегетативный рост всех указанных штаммов угнетался изолейцином, пролином, серином и в больших концентрациях - треонином. Угнетающее действие их снимается различными аминокислотами, большинство которых являются равнозначными для разных штаммов. Однако в отдельных случаях, например, с треонином, отмечаются значительные различия, особенно со штаммами разных серотипов.

Для изучения влияния отдельных витаминов группы В на выращивание шт. 1000 серотипа *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* применялось глубинное выращивание культуры на качалке, применялась модифицированная среда Хау-Крюкенка (Howie, Cruickshank) с 0,02% гидролизата казеина. Среда имела следующий состав/на 1л дистил. воды/

Аспарагинат натрия	- 1,0 г
Глюкоза	- 1,0 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	- 0,2 г
$NH_4H_2PO_4$	- 1,5 г
$CaCl_2$	- 0,1 г
KCl	- 0,1 г
$FeCl_3$	- следы
Конечный pH среды	- 7,2-7,4.

Среда заражалась 10-12-часовой культурой в конечном титре около одного миллиона кл./мл. Учет роста производился определением экстинции культуральной жидкости с помощью ФКН-56, кювета 5, светофильтр 7. Конечные концентрации внесенных витаминов соответствовали (гамма/мл): тиамин, рибофлавин, пантотенат кальция, пиридо-

кисл., никотиновая к-та, фолиевая к-та - 1,0, биотин - 0,008, пара-
аминобензойная к-та - 0,2, витамин В₁₂ - 0,5.

Таблица 6

Характеристика аминокислотной и витаминной
зависимости культур *Bac.cereus-thuringiensis*

Виды, серотипы	Аминокислоты	Витамины
1	2	3
<i>Bac. thuringiensis</i> <i>berliner</i>	<u>арг</u> , <u>асп</u> , <u>ала</u> , <u>глу</u> , мет, тре	<u>Тиамин</u>
"-" <i>sotto dendrolimus</i>	<u>арг</u> , <u>асп</u> , <u>глу</u> , <u>гис</u>	Биотин, тиамин
"-" <i>caucasicus</i>	<u>арг</u> , <u>гис</u> , <u>глу</u>	
"-" <i>galleriae</i>	<u>гис</u> , <u>глу</u> , <u>ала</u> , <u>арг</u> (совместно с нико- тиновой кислотой)	<u>Никотиновая</u> <u>к-та</u> , биотин
"-" <i>alesti</i>	<u>арг</u> , мет, <u>гис</u>	Биотин
"-" <i>entomocidus</i>	<u>арг</u> , <u>гис</u> , мет, <u>вал</u>	
"-" <i>tolworth</i>	тре, <u>арг</u> , <u>асп</u>	
"-" <i>morrisoni</i>	<u>вал</u> , <u>асп</u> , <u>тре</u>	
<i>Bac. thuringiensis</i> несеротипируемые	<u>арг</u> , <u>гис</u> , <u>асп</u> , <u>глу</u> , <u>вал</u>	Тиамин, биотин, парааминобен- зойная к-та, ни- котиновая к-та
<i>Bac. cereus</i> несеротипируемые	<u>асп</u> , <u>глу</u> , <u>гли</u> , <u>вал</u> , <u>тре</u>	Тиамин
"-" серотип. <i>alesti</i>	<u>асп</u> , <u>глу</u> , <u>гли</u> , <u>гис</u>	
"-" серотип. <i>galleriae</i>	<u>асп</u> , <u>глу</u> , <u>гис</u> , <u>тре</u>	

Ростовое и угнетающее действие аминокислот на
развитие некоторых перспективных штаммов *Bac. thuringiensis*

Серотип, штамм	Стимулирующий рост	Угнетает рост	Снижает угнетающее действие
<i>galleriae</i> , шт. 1000	асп, глү, гли, вал, лей, гис	илей, про, сер, тре	Изолейцина - вал, мет, лей Серина - асп, глү, мет, лей Треонина - глү, вал, мет, гис
"-" шт. 829	асп, глү, гли, тир, вал, мет, лей, гис, лиз	илей, про, сер, тре	Изолейцина - вал, мет, лей Серина - глү, мет, цис Треонина - вал
<i>berliner</i> , шт. 647	арг, асп, тир, глү, гли, мет, лей, гис	илей, про, сер, тре	Изолейцина - ала, вал, мет, лей Серина - арг, глү, гли, гис, мет, цис Треонина - ала, арг, тир, глү, вал, мет, лей

Для более рельефного обнаружения влияния витаминов на рост, образование спор и кристалловидных токсинов испытуемого штамма варианты опытов включали добавки отдельных витаминов и смесь всех витаминов группы В с исключением одного из витаминов.

Как видно из данных таблицы 8, решающим условием для обеспечения оптимального роста изученного штамма серотипа является добавление к питательной среде никотиновой кислоты. Во всех случаях, когда испытываются все остальные витамины группы В в отдельности или смесь витаминов с исключением какого-либо другого витамина, но с содержанием никотиновой кислоты отмечается значительный ростовой эффект. Некоторый рост в вариантах опыта без никотиновой кислоты объясняется использованием непромытого посевного материала.

В дальнейших исследованиях, когда посевной материал предварительно промывался трехкратным центрифугированием суспензии, ростовой эффект в вариантах без никотиновой кислоты не отмечался. По данным рассматриваемой таблицы, наибольший процент образования энтомоцидных кристаллов обнаруживается в вариантах опыта с использованием никотиновой кислоты. Вообще, выявляется довольно заметный процент увеличения кристаллообразования во всех случаях с использованием витаминов по сравнению с контролем с применением среды без витаминов.

Определенной закономерности влияния витаминов на спорообразование не устанавливается, за исключением варианта с использованием тиамина, который проявляет угнетающее действие.

В таблице 9 приведены сводные данные по изучению влияния аминокислот в смеси с никотиновой кислотой на рост сравнительно фагоустойчивой культуры серотипа *galleriae*, выделенной в нашей лаборатории. В опыте, результаты исследований которого спустя 20 часов представлены в этой таблице, применялись следующие конечные концентрации аминокислот (гамма/мл): аланин - 550; аргинин - 1300; гистидин - 1200; глутаминовая к-та - 900; треонин - 750; аспарагиновая к-та - 800. Никотиновая кислота добавлялась с расчетом получения конечной концентрации в среде - 10 гамма/мл. Посевной материал до внесения в пробирки промывался трехкратным центрифугированием.

Таблица 8

Влияние витаминов на рост, споро- и токсинообразование культуры *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* шт.1000 (Среда Хау-Крыкшенка с 0,02% гидролизата казеина, данные экстинции в разведении 1/10)

№ пп	Варианты опытов, добавки к среде	Экстинция	Процент образования	
			спор	кристаллов
1.	Тиамин	85	40	50
2.	Смесь витаминов с исключением тиамина	35	90	60
3.	Рибофлавин	86	80	50
4.	Смесь витаминов с исключением рибофлавина	32	70	30
5.	Пантотенат кальция	91	80	40
6.	Смесь витаминов с исключением пантотената кальция	30	70	40
7.	Пиридоксин	91	80	50
8.	Смесь витаминов с исключением пиридоксина	25	70	40
9.	Никотиновая кислота	25	80	90
10.	Смесь витаминов с исключением никотиновой кислоты	81	40	50
11.	Фолиевая кислота	81	70	40
12.	Смесь витаминов с исключением фолиевой кислоты	32	70	70
13.	Витамин B ₁₂	83	70	30
14.	Смесь витаминов с исключением витамина B ₁₂	31	80	40
15.	Парааминобензойная к-та	88	70	30
16.	Смесь витаминов с исключением парааминобензойной к-ты	25	80	50
17.	Биотин	89	60	30
18.	Смесь витаминов с исключением биотина	27	90	50
19.	Контроль, среда+все витамины	25	80	40
20.	Контроль, среда без витаминов	98	60	20

Таблица 9
Влияние витаминов и аминокислот на рост культуры
Bac.thuringiensis var.galleriae шт. 829

Варианты опытов, добавки к среде	Титр клеток, млн/мл
Гидролизат казеина 1%	40
Никотиновая к-та+гидролизат каз.	2000
-"- гис + асп + тре	1500
-"- гис + асп	75
-"- асп + тре	60
-"- гис + тре	100
-"- глу	60
-"- гис	70
-"- асп	70
-"- арг	100
-"- глу + гис + асп	70
-"- глу + гис	130
-"- глу + асп	100
-"- тре + ала + гис	150
-"- глу + тре	100
-"- ала + тре	70
-"- арг + гис	100
-"- арг + гис + тре	300
-"- глу + асп + тре	100
-"- тре + гис + асп	150

Как видно из приведенных данных, наилучший рост культуры устанавливается в вариантах опыта с применением смесей никотиновой кислоты + гидролизата казеина и никотиновой кислоты в смеси с гистидином, аспарагиновой кислотой и треонином. В контрольной серии испытаний, когда применялась никотиновая кислота без гидролизата казеина, вегетативный рост практически не отмечался.

В ы в о д ы

I. Энтомопатогенные бактерии группы *Bac.sereus-thuringiensis* характеризуются зависимостью от различных аминокислот, а отдельные разновидности нуждаются также в витаминах группы B.

Рост культур этих бактерий угнетается серином, изолейцином, треонином. Это угнетение снимается под влиянием валлина, меткионина и некоторых других аминокислот.

Культуры серотипа caucasicus выделяются наиболее выраженной зависимостью от аминокислотного питания.

2. Испытанные штаммы серотипа berliner, кроме зависимости от аминокислот, характеризуются специфической зависимостью от тиамина, а некоторые из испытанных штаммов серотипов alesti и sotto-dendrolimus от биотина и тиамина. Культуры серотипа galleriae зависят одновременно от аминокислот и никотиновой кислоты.

3. В группе несеротипируемых штаммов Bac. thuringiensis обнаружены культуры, нуждающиеся в тиамене, биотине, парааминобензойной и никотиновой кислотах.

Среди испытанных штаммов Bac. cereus выявлены отдельные культуры, нуждающиеся в тиамене.

Է. Կ. Աֆրիկյան, Զ. Գ. Ավագյան, Ռ. Հ. Բոքիկյան,
Կ. Օ. Զիլինգարյան, Ս. Ն. Բաղդասարյան

ԷՆՏՈՍՈՐԱՅԻՆՆԵՐ ՍԳՈՐԱՎՈՐ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼՆԵՐԻ
ՎԻՏԱՄԻՆԱՅԻՆ ԵՎ ՍՄԻՆԱԿՆԵՐԻ ՊԱՆԱԶԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Bac. cereus-thuringiensis խմբին պատկանող էնտոմոպաթոգեն սպորավոր բակտերիաներն իրենց վեգետատիվ աճի համար պահանջում են ամինաթթուներ, առանձին տարաբանակներ պահանջում են նաև B խմբին պատկանող վիտամիններ: Այսպես, berliner սերոտիպի ուսումնասիրված շտամները, բացի ամինաթթվային պահանջից, բնութագրվում են նաև թիամինի նկատմամբ ռևենցած յուրահատուկ պահանջով, իսկ alesti և sotto-dendrolimus սերոտիպերի փորձարկված որոշ շտամների թիամինի և թիամինի պահանջով: Galleriae սերոտիպի հետազոտված շտամները իրենց վեգետատիվ աճի համար պահանջում են միածամանակ ամինաթթուներ և նիկոտինային թթու:

Caucasicus սերոտիպի ուսումնասիրված բոլոր շտամները բացառապես պահանջում են ամինաթթուներ:

Եզված բակտերիաների վերահասիվ աճը ճնշվում է սերինի, -
իզուլինի և արգինինի ապառքում: Այդ սինթեզները ճնշ-
ող ազդեցությունը վերանում է վալինի, մեթիոնինի և այլ սինթե-
զներին ներկայությամբ դեպում:

Ե.Կ.Աֆրիկյան, Յ.Գ.Ավակյան, Բ.Ա.Բոբիկյան,
Կ.Օ.Շիլինգարյան, Ս.Ն.Բագդասարյան

VITAMIN AND AMINO ACID REQUIREMENTS OF ENTOMOPATHOGENIC SPOREFORMING BACTERIA

S u m m a r y

Entomopathogenic bacteria belonging to *Bac.cereus-thuringiensis* group have amino acid requirements, mainly to histidine, arginine, glutamic and aspartic acids. Some serotype of this group need in vitamins of group B. The growth of bacterial cultures is inhibited under the action of isoleucine, serine and partly of threonine. The cultures of *Bac.thuringiensis* var. *caucasicus* are characterised by very wide amino acid requirements.

The strains of serotype berliner besides amino acids specific need thiamine and serotype galleriae has dependance as well to the nicotinic acid as amino acid. Among the tested cultures of *alesti*, *sotto-dendrolimus* as well as *Bac.cereus* some strains depending from biotin and thiamine have been found. Among the cultures of *Bac.thuringiensis*, which don't serotypised by H-antigens of known serums, have been found strains requiring thiamine, biotine, para-aminobenzoic and nicotinic acids.