

Р.А.Бобикян, Л.А.Чил-Акопян, К.О.Чилингарян,
И.А.Киракосян, А.Б.Аджиан, А.Ю.Исмаилова, Э.К.Африян

УСЛОВИЯ СОХРАНЕНИЯ И РЕПРОДУКЦИИ АКТИВНОСТИ
КУЛЬТУР *BAC. THURINGIENSIS*

Оптимальные условия репродукции штаммов, используемых для производства бактериальных инсектицидов, изучены слабо.

В лабораторных условиях на различных питательных средах культуры-кристаллофоры сохраняют свои вирулентные энтомоцидные свойства в неодинаковой степени. Уже в ранних работах (Metalnikov, Chorine, 1929; Paillot, 1933; Пospelов, 1939) при работе с культурами, именовавшимися как *Bac. galleriae*, указывалось на усиление вирулентности бактерий при их предварительном выращивании в сравнительно анаэробных условиях.

Было установлено (Metalnikov et al., 1931, 1935; Steinhauz, 1960), что кристаллообразующая активность этих бактерий на искусственных средах менее стабильна в условиях жидкой питательной среды (МПБ), при сравнительно высокой температуре (34°); и отчасти, в присутствии глюкозы. Отмечалось, что культуры бактерий *Bac. thuringiensis* наиболее вирулентны при нейтральной и щелочной реакции среды (Нусз, 1929). По данным французских авторов (Toumanoff, 1952), культивирование *Bac. thuringiensis v. alesti* в щелочной среде сопровождается потерей у них способности к образованию кристаллов. Имеются указания о возможности приспособления *Bac. cereus* к развитию в сравнительно щелочных условиях. Так, отдельные штаммы *Bac. cereus*, не образующие энтомоцидных кристаллов, патогенны к насекомым, рН кишечного содержимого которых лежит в сравнительно щелочных пределах (Heimpel, 1955). Путем систематических пересевов на средах штамм *Bac. cereus*, не развивающийся при рН более 9,5, был приучен к росту на среде с рН 10,3, что обуславливает его вирулентные свойства (Kushner, Lisson, 1959).

По данным Полтева (1960), лучшей средой для поддержания патогенности *Bac. dendrolimus*, в смысле образования энтомоцидных кристаллов, является картофельный агар с добавлением 0,5% пептона (Гукасян, 1966). Гукасян и Маманов (1969) получили осо-

бенно хорошие результаты по поддержанию активности культур-кристаллофоров при хранении их на семенах злаковых.

Французские авторы успешно использовали хранение этих бактерий в виде таблеток из крахмала с тальком в течение 5 лет (Vango et al., 1961). Талалаев (1969) успешно хранил *Bac. dendrolimus* в трупных порошках гусениц шелкопряда в течение 20 лет.

Опубликованы сообщения по изысканию различных питательных сред и условий культивирования на образование энтомоцидных кристаллов разными штаммами *Bac. thuringiensis* (Ло Бан-си и др., 1965; Зырянов, 1967). Получены положительные результаты при использовании различных растительных экстрактов, а также вытяжек из гусениц и куколок сибирского шелкопряда (Гукасян, 1959; Рябова, Помазова, 1960). Не отрицая ценности использования нативных субстратов растительного, животного и энтомогенного происхождения, надо указать на почти невозможность, при этих условиях, стандартизации состава сред и воспроизводимости полученных результатов.

Ряд авторов отмечает изменение вирулентности *Bac. thuringiensis* в смешанных культурах с другими микроорганизмами (Яловицын, 1966), в частности, усиление ее при совместном выращивании этих штаммов с *B. prodigiosum*, *Ps. pyocyanea* (Исакова, 1954, 1959).

Большая работа в указанном направлении выполнена Исаковой и Строевой (1968), которые показали, что вирулентные свойства штаммов серотипа *galleriae* могут сохраняться в лиофилизированном состоянии в течение года. Авторы, однако, не приводят данных о репродукции кристаллообразующей активности и спорогенной способности испытанных культур.

Изучение условий оптимального хранения культур *Bac. thuringiensis* проводилось нами с использованием различных питательных сред, на которых поддерживались штаммы. С применением этих сред были заложены опыты по консервации культур в условиях длительного хранения.

Для лиофилизации культур применялось предварительное замораживание суспензии бактерий в ампулах, производимое помещением последних в ванну с изопропиловым спиртом и сухим льдом.

Культуры выращивались на жидких средах в течение 3-х суток, центрифугировались; полученная биомасса разводилась в суспензии

онных средах и разливалась пастеровской пипеткой по ампулам. Разведение биомассы производилось с расчетом внесения в ампулы суспензии с титром 1 млрд спор и клеток в 1 мл.

Ампулы после запаивания хранились при комнатной температуре. Остаточная влажность лиофилизированной суспензии - 1-2%.

При учете результатов опытов образование спор отмечалось в процентах, что отражало соотношение сводобных спор к числу вегетативных клеток при микроскопии окрашенных препаратов.

Процент кристаллообразования показывает соотношение числа кристаллов к количеству спор, принятых за 100%. В таблицах представлены округленные данные, в частности, спорообразование порядка 90-95% отмечается как 100%.

Нами было изучено хранение культур-кристаллофоров и репродукция их активности на различных питательных средах и субстратах. В таблице 1 подытожены данные о сохранении жизнеспособности и кристаллообразующей активности культур разных серотипов в смеси с почвой, крахмалом и глицерином. В опытах применялись огородная бурая почва и картофельный крахмал. Глицерин применялся, учитывая сообщения некоторых авторов (Quadling, 1960) о положительных результатах хранения в смеси с ним некоторых бактериальных культур. Пастеризованная суспензия 6-дневных культур на МПА вносилась с расчетом получения конечного титра бактерий в количестве 100 мл спор на 1 г субстрата.

В глицерин, использованный в концентрациях 30-60-100%, добавлялась биомасса спорулировавшей культуры. Все субстраты с культурами хранились при комнатной температуре. Как показывают полученные результаты, основная масса бактерий в почве и крахмале является в виде спор, что не отмечается при хранении культур в глицерине. Репродукция токсигенной активности испытываемых культур при высевах на МПА является достаточно высокой.

В течение ряда лет нами изучалось хранение *Bac. thuringiensis* в порошкообразном виде в трупиках гусениц тутового шелкопряда, погибших от искусственного заражения подкормкой этими культурами. Данные исследований о консервировании разных культур кристаллофоров в течение четырех лет, подытоженные в таблице 2, показывают весьма обнадеживающие результаты. Основная масса бактерий из погибших гусениц сохранялась в виде спор с очень высокой степенью жизнеспособности. Особый интерес пред-

Таблица I
Известность и сохранение токсигенной активности (кристаллообразования)
при консервации культур кристаллофоров в почве, крахмале и глицерине
(данные анализов после 3-х месячной консервации)

Субстрат	Серотип, культура (№ штаммов по коллекции ИНИИ Арм., №)	Количество жизнеспособных клеток и спор (млн/г)	Кол-во спор (млн/г)	Репродукция спор на МПА, %	
				с п о р ы	токсины
Почва	dendrolimus шт. 1001	32	30	90	100
	galleriae шт. 1000	46	32	60	70
	шт. 1005	20	10	70	90
Крахмал	dendrolimus шт. 1001	56	50	70	80
	galleriae шт. 1000	40	38	80	90
	шт. 1005	22	18	80	80
Глицерин (50%)	dendrolimus шт. 1001	180	0,5	50	100
	galleriae шт. 1000	160	4	70	80
	шт. 1005	200	5	80	70

№) ИНИИ Арм. - условное сокращение коллекции культур бактерий
Института микробиологии АН Арм. ССР.

оставляет этот способ для хранения штаммов серотипа *caucasicus*. Как показывают представленные в таблице результаты исследований, штаммы 805 и 8II данного серотипа весьма стойко сохраняют свою кристаллообразующую активность, что обычно не отмечается в процессе их хранения на питательных средах.

Таблица 2

Жизнеспособность и сохранение токсиногенной активности (кристаллообразования) при консервации культур *Bac. thuringiensis* в трупном порошке гусениц тутового шелкопряда (данные анализов после 4-х месячного хранения)

Серотип, культура		К-во жизнеспособных клеток при высеве на МПА в млрд/г		Репродукция спор в % на МПА	
		всего	спор	споры	токсины
<i>caucasicus</i>	шт. 805	90	90	80	70
<i>caucasicus</i>	шт. 8II	170	150	100	70
<i>galleriae</i>	шт. 1000	40	38	100	90
<i>dendrolimus</i>	шт. 923	20	15	70	100
<i>dendrolimus</i>	шт. 898	100	100	100	100

При изучении условий хранения и поддержания активности культур *Bac. thuringiensis* на различных питательных средах нами была установлена сравнительно большая пригодность агаризованных сред. Выявлены определенные различия в интенсивности споро- и кристаллообразования культур разных серотипов на различных средах. Так, штаммы серотипов *galleriae*, *caucasicus* характеризуются высоким процентом образования спор и кристаллов на картофельном агаре, тогда как испытанные культуры серотипа *berliner* более хорошо спорулировали и продуцировали кристаллы на среде Хотингера. Капустный агар оказался самой лучшей средой для производственно-го штамма *Bac. thuringiensis var. galleriae*, но явился менее благоприятной для споруляции и токсинообразования изученных двух штаммов серотипа *caucasicus*. В процессе этих исследований нам не удалось добиться восстановления высокой активности токсинообразования в процессе пересевов на различные среды и инкубации при температурах 12°, 18°, 28°, за исключением штамма № 1000 серотипа *galleriae*, при использовании капустного агара.

Полученные результаты свидетельствуют о значительных различиях в отношении к испытанным средам у культур разных серотипов. По-видимому, нельзя рекомендовать одну и ту же среду, равно как и условия инкубации, для хранения разных штаммов.

На массовом материале культур различных серотипов *Bac. thuringiensis* нами было изучено сохранение и репродукция спор и кристаллообразования на одной питательной среде в одинаковых условиях инкубации. В работе была использована вся коллекция музейных и оригинальных штаммов кристаллофоров, хранимых в нашей лаборатории. Среди оригинальных штаммов имелись культуры, выделенные как из насекомых, так и из других субстратов незантомогенной природы. Используемые культуры были серотипированы сыворотками к Н-антигенам известных серотипов *Bac. thuringiensis*. Культуры высевались из пастеризованных суспензий на скошенный МПА в пробирках, инкубировались 5 дней при 28°, и после хранения в течение года при 8-10° в холодильнике, проверялись на репродукцию токсиногенной и спорообразующей активности с рассевом на МПА в чашках Петри.

Представленные в таблицах данные указывают на неодинаковую степень сохранения и репродукции токсинообразующих свойств у культур-кристаллофоров разных серотипов. Штаммы серотипа *gallesiae* отличаются наиболее высокой степенью сохранения кристаллообразующей активности и их репродукции. Из 20 испытанных штаммов данной разновидности лишь у двух культур было выявлено после годичной консервации снижение кристаллообразования (табл.3). Наоборот, при изучении 35 культур серотипа *caucasicus*, более, чем у половины штаммов было отмечено снижение токсинообразующих свойств. У отдельных культур оно было довольно значительным, граничащим с утерей способности образовывать зантомоцидные кристаллы. Представители серотипов *sotto-dendrolimus*, *alesti*, *berlinensis* занимают промежуточное положение (табл.4). При репродукции культур этих разновидностей отмечаются резко различные данные: обнаруживаются как стойкое сохранение токсинообразования, так и его снижение и утеря. Аналогичная картина отмечается в группе несеротипируемых культур *Bac. thuringiensis*, которые включают, по-видимому, новые разновидности этого вида. Среди других изученных серотипов, представленных единичными штаммами, отмечена вы-

репродукция токсикогенности.

Таблица 3

Репродукция споро- и кристаллообразования культур
Bac. thuringiensis серотипов *galleriae* и *caucasicus*
 (образование спор и кристаллов в %)

Серотипы, № штам- мов	Исходная культура		Репродукция, спустя год, на МПА	
	споры	кристаллы	споры	кристаллы
<i>galleriae</i>				
820, 821, 829, 845, 846, 847, 850, 851, 856, 857, 883, 897, 904, 906, 1005	100	100	90	100
818, 859, 922	100	50	60	60
861, 877	100	100	90	20
<i>caucasicus</i>				
811, 831, 837, 839, 841, 844, 871, 873, 879, 880, 884, 887, 889, 891, 911, 920, 939, 957	100	90	90-100	70-80
828, 853, 875, 876, 893, 895, 914, 915, 917, 919, 925, 926	100	70-80	80-90	40-50
896, 905, 918, 921, 924	100	70-30	90	10-20

Консервация культур методом лиофилизации была изучена на 4-х штаммах, представлявших серотипы *berliner*, *sotto*, *alesti*, *caucasicus*.

При этом, особое внимание уделялось разработке вопросов оптимальной подготовки культур для лиофилизации, а также репродукции высушенных бактерий с высокой токсигенной активностью. Опыты показали, что из испытанных в нашей работе питательных сред наиболее благоприятными для спорообразования штамма 811 серотипа *caucasicus* являются среды Хау и Крюкшенка (ср-IV) и Ямамото (ср-V) с добавлением соответственно 0,5 и 1% гидролизата казеина, а для штамма 1000 серотипа *galleriae*, - модифицированные среды Андерсона (ср-II), Приджема (ср-III) и ср-IV с 1% гидролизата казеина. Культуры серотипов *dendrolimus* (шт. 49-3) и *berliner* (шт. 647) наибольшую интенсивность спорообразова-

ния проявляют на среде Хау и Крикшенка - СРІУ. Исследования показали, что подготовка спорового материала на различных средах не оказывает значительного влияния на лиофилизацию штаммов и последующее их оживление и репродукцию кристаллообразующей способности. В общем одинаковые результаты нами были получены при лиофилизации бактериальных спор в питательной среде и в водной суспензии (физ.раствор).

Таблица 4

Репродукция споро- и кристаллообразования серотипов *berliner*, *alesti*, *sotto-dendrolimus* и несеротипируемых культур *Bac. thuringiensis*.
(обозначение спор и кристаллов в %)

Серотипы, № штаммов	Исходная культура		Репродукция, спустя год, на МПА	
	споры	кристаллы	споры	кристаллы
<i>sotto-dendrolimus</i>				
1001, 1006, 1010,	100	100	90-100	80-90
898, 1002	100	50	90	50
923, 958	100	0-10	80-90	0
<i>berliner</i>				
728, 995	100	100	90	50-70
949, 990	100	10	90	10
<i>alesti</i>				
741	100	100	80	10
890	100	100	100	100
<i>Bac. thuringiensis</i>				
несеротипируемые				
810, 852, 858, 899, 902, 913	100	10-30	90-100	0-10
848, 862, 874, 881, 900, 927	100	90-100	80-100	70-100
903, 912	100	50-60	90-100	70-80

На материале двух культур - штамм 811 серотипа *caucasicus* и шт. 1000 серотипа *galleriae* было изучено влияние суспензионных сред на консервацию и репродукцию токсиногенной активности бактерий. Результаты опытов не выявили значительных разли-

Таблица 5

Сохранение споро- и кристаллообразующей способности разных культур *Vas. thuringiensis* после лиофилизации (данные микроскопии, образование токсинов и спор в процентах)

Суспензионная среда, серотип и микотетимы штаммы	Лиофилиз. порошок		Репродукция из лиофилиз. порошка спустя 6 месяцев на МПА					
	споры	кристаллы	пастеризов. посев			непастеризов. посев		
			споры	кристаллы	споры	кристаллы	споры	кристаллы
<u>Молочная среда</u>								
caucasicus 8II	60	40	70	50	80	50	80	50
galleriae 1000	90	60	70	50	70	50	70	60
dendrolimus 49-3	90	50	70	60	60	60	60	40
<u>Mist. desiccans</u>								
caucasicus 8II	80	50	100	70	100	70	100	70
galleriae 1000	60	60	60	50	180	50	180	60
dendrolimus 49-3	70	50	70	60	90	60	90	50
<u>Физкол. раствор</u>								
caucasicus 8II	80	50	70	50	70	50	70	50
galleriae 1000	90	60	80	30	60	30	60	40
dendrolimus 49-3	100	70	70	50	70	50	70	40

чий испытанных суспензионных сред, хотя несколько лучшие данные были получены с использованием среды *Mist.deviscana*. Практически важно, что лиофилизация спорулировавших культур непосредственно в питательной среде, т.е. без отделения биомассы и ее последующего суспендирования в защитных средах, дает весьма хорошие результаты как по сохранению жизнеспособности, так и последующей репродукции энтомоцидной активности бактерий.

Сравнительное испытание различных сред для оживления лиофилизированных культур и репродукции их активности показало наибольшую эффективность применения среды Ямамото. По сохраняемости спорообразования и репродукции кристаллообразующей способности нами были получены хорошие результаты с использованием в качестве суспензионной среды физиологического раствора с добавлением 10% глицерина. Однако применение глицерина приводит к размазыванию содержимого ампул, вспениванию его в процессе высушивания и препятствует получению желательной порошковидной массы.

В таблице 5 представлены выборочные результаты опытов по изучению сохраняемости культур и их энтомоцидной активности (по кристаллообразованию), спустя 6 месяцев после их консервации в лиофилизированном состоянии. Эти данные свидетельствуют о высокой, аналогичной исходным посевным культурам, степени споро- и кристаллообразования лиофилизированных штаммов после их репродукции, спустя 6 месяцев. Существенно важно, что этот вывод подтверждается как на материале исследований по изучению лиофилизированной массы в момент закладки опыта, так и при репродукции культур на МПА после 6-месячного хранения при комнатной температуре.

В ы в о д ы

1. Сравнительное изучение различных сред на споро- и токсинообразования культур *Bac.thuringiensis* выявило большую эффективность применения агаризованных сред. Сохранение способности к образованию энтомоцидных кристаллов штаммами *var.galleriae* и *var.caucasicus* и их репродукции на средах с вазелиновым маслом и без него не выявило заметных различий при консервации их в течение года. Восстановления кристаллообразующей активности на испытанных жидких и твердых средах не отмечено.

2. На материале около 100 культур коллекции музейных и оригинальных штаммов различных серотипов *Bac. thuringiensis* были изучены сохранение и репродукция споро- и кристаллообразования в процессе пересевов на одной питательной среде в одинаковых условиях инкубации.

Среди культур всех испытанных серотипов представители разновидности *galleriae* характеризуются сохранением наиболее высокой степени кристаллообразования, наименьшей — представители сравнительно фагоустойчивого серотипа *saucavicus*.

3. Получены обнадеживающие результаты хранения отдельных производственных штаммов *Bac. thuringiensis* с высокой степенью репродукции активности кристаллообразования в почве, крахмале и в погибших гусеницах тутового шелкопряда.

4. Консервация посевного материала культур *Bac. thuringiensis* методом лиофилизации не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность спор и клеток и репродукцию энтомопатогенной (по кристаллообразованию) активности культур.

5. Выращивание культур разных серотипов на различных средах и использование различных суспензионных сред не оказывает значительного влияния на консервацию методом лиофилизации штаммов *Bac. thuringiensis* и последующую репродукцию их кристаллообразующей активности (срок наблюдения 6 месяцев). При хранении культур и репродукции их энтомоцидной активности решающими условиями являются высокая спорулирующая способность и исходная кристаллообразующая активность штамма.

Ռ. Հ. Բոբրիկյան, Լ. Ա. Զիլ-Հակոբյան, Կ. Հ. Զիլինգերյան,
Ի. Ա. Կիրակոսյան, Ա. Բ. Ադիմյան, Ա. Թ. Իսմաիլովա,
Ե. Գ. Աֆրիկյան

BAC. THURINGIENSIS ԿՈՒՆՏՈՒՐԵՐԻ ԳԱՀՊԱՆՄԱՆ
ԵՎ ՎԵՐԱՐՑԱՆՄԱՆ ԳԱՅՄԱՆԵՐԸ

Ա Մ Փ Ո Փ ՈՒ Մ

Ուսումնասիրվել է *Bac. thuringiensis* տեսակի կուլտուրաների պահպանման և վերաբազմման համար տարբեր պայմանների ազ-

դեցությունը: Գործվել է, որ տարբեր սերոտիպերին պատկանող
 կուլտուրաների բյուրեղանման տոթսին առաջացնելու ակտիվու-
 թյունը տարբեր է ՄՊԱ սենդամիջավայրի վրա երկար պահելու դեպ-
 քում: Վաղելիության յուրի մակ կուլտուրաների պահպանումը
 առավելությունն էի ցուցաբերել:

Կուլտուրաների պահպանման և վերարտադրման համար բարե-
 նդրաստ են համարվել հողը, Օսլան, պատկած շերամորդը, ինչպես
 նաև լիոֆիլիզացված վիճակում պահելը:

R.H.Bobikian, L.A.Chil-Hakobian, K.O.Chilingarian,
 I.A.Kirakossian, A.B.Adimian, A.Y. Ismailova, E.G.
 Afrikian.

CONDITIONS OF PRESERVATION AND REPRODUCTION OF THE ACTIVITY OF THE CULTURES OF BAC.THURINGIENSIS

S u m m a r y

The conditions of preservation and reproduction of the
 cultures of Bac.thuringiensis have been studied.

It was established the differences to form crystalline
 toxins on the nutrient agar under the long observed period.
 The advantage of preserving the cultures inder vaseline oil
 has been revealed. Favourable for the preservation and the re-
 production of the cultures have been found to be soil, starch,
 dead larvae of silkworm and also keeping them by lyophlization