

УГЛЕРОДНОЕ ПИТАНИЕ БАКТЕРИИ
BACILLUS POPILLIAE

С. Н. БАГДАСАРЯН, Э. Г. АВАКЯН, Э. К. АФРИКЯН

Среди испытанных источников углеродного питания усвояемыми для культур *Bac. popilliae* оказались трегалоза, глюкоза, фруктоза, лактоза, мальтоза, сахароза. Отменена стимуляция вегетативного роста при внесении в среду барбитуровой, фумаровой и шавелевой кислот, повышающих также образование телец Костилоу. Образование типичных спор на всех испытанных источниках углерода не отмечено.

Ключевые слова: *Bacillus popilliae*, углеродное питание.

Спорообразующие бактерии, объединяемые в вид *Bac. popilliae*, являются возбудителями так называемой молочной болезни японского жука и служат основой для выработки инсектицидных препаратов в борьбе с этим и другими особо вредоносными насекомыми [1, 2, 5, 15]. Перспективы использования культур данного вида в промышленном производстве бактериальных инсектицидных препаратов ограничены, поскольку до настоящего времени не выявлены условия получения массовой споруляции этих бактерий при выращивании их на искусственных питательных средах. Выработка инсектицидного препарата из этих бактерий осуществляется в США, в малом количестве, весьма трудоемким путем: методом заражения личинок японского жука бактерии инъецируются в гемолимфу, а затем, спустя 3 недели после гибели личинок, из них готовится препарат для практического применения. Культуры бактерий указанного вида представляют исключительный интерес, поскольку они—при возможности их выращивания и споруляции на искусственных средах—могут служить основой для производства инсектицидных препаратов против таких видов насекомых, в борьбе с которыми эффективных средств практически не имеется.

Необходимо отметить, что лишь в последние годы достигнуты определенные успехи в выращивании культур *Bac. popilliae* со слабой степенью споруляции на искусственных питательных средах [10—12]. Следует подчеркнуть также, что большие трудности по выращиванию культур *Bac. popilliae* на искусственных питательных средах не позволили изучить в полной мере физиологию питания этих бактерий, а многие данные по указанному вопросу оказались недостоверными и весьма разноречивыми.

Не менее важно отметить, что различные авторы использовали в своих работах разные культуры бактерий, нередко резко отличавшиеся друг от друга, в особенности по вирулентности к насекомым.

В последние годы проведены детальные исследования биохимических сдвигов в процессе выращивания культуры *Vac. porilliae* [4], в том числе в условиях непрерывного вегетативного роста в проточных культурах [13]. Выявлены и охарактеризованы экстрахромосомальные ДНК, наличие которых может быть связано с регуляцией спор- и токсинообразования [9].

Задачей наших исследований являлось изучение углеродного питания штаммов *Vac. porilliae* различного происхождения.

Материал и методика. В работе были использованы 5 штаммов *Vac. porilliae*. Штаммы 1883, 1884 и 1885 получены из Северной региональной станции Министерства с/х США в г. Пеория, а штаммы 1886 и 1887—из Лаборатории биологической борьбы в Ла Мишере (Франция). Опыты по определению углеродного питания *Vac. porilliae* ставились в два этапа: первоначально методом ауксинографии на агаре в чашках Петри определялась качественная потребность в углеводах, далее на жидких питательных средах методом титрации определялись оптимальные концентрации усвояемых углеводов с учетом вегетативного роста путем нефелометрирования. Образование спор и параспоральных включений учитывалось при помощи микроскопии живых препаратов.

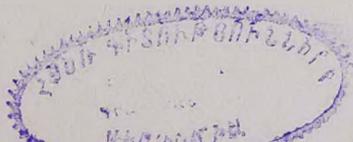
Во всех опытах основной средой служила питательная среда ср. П, содержащая: K_2HPO_4 —0,6, глюкозу—0,2, гидролизат казеина—1,5%, тиамин—400, биотин—2 мкг/л. Окончательный pH среды после стерилизации в течение 20 мин при 117°—7,4—7,5. Глюкоза стерилизовалась отдельно, пропусканием через фильтр Зейтца и последующим добавлением в стерилизованную среду. Посевным материалом служила 24-часовая культура, также выращенная на жидкой питательной среде с гидролизатом казеина.

Испытанные штаммы выращивались на агаризованных и жидких средах как в стационарных, так и глубинных условиях роста. Интенсивность роста определялась нефелометрически на ФЭКН-56, светофильтр № 7, кювета 3,08. В большинстве случаев данные корректировались прямым счетом числа клеток в счетной камере Горяева.

Результаты и обсуждение. Предварительными опытами методом ауксинографии на агаризованной среде ср. П было установлено, что вегетативный рост всех испытанных 5-ти штаммов *Vac. porilliae* стимулируется глюкозой, фруктозой, трегалозой, лактозой, мальтозой, сахарозой. Рост этих культур не стимулировался при внесении в среду других углеводов: арабинозы, рамнозы, ксилозы, галактозы, рибозы, целлобозы, раффинозы, сорбозы, маннита, дульцита, сорбита, инулина, декстрина, арабитола, глицерина, а также при внесении растворимого крахмала, о чем указывалось другими авторами, в частности Датки [8], описавшим штамм *Vac. porilliae*, для выращивания которого необходимо добавление в среду 0,1%-ного растворимого крахмала.

В опытах на жидких средах наиболее выраженный ростовой эффект давало внесение глюкозы и трегалозы. Титр бактерий спустя 22 ч после инкубации на качалке достигал 11—15 млн кл/мл. Другие изученные углеводы, слабо стимулирующие рост в опытах, проведенных методом ауксинографии, особого действия не оказывали.

Нами было изучено влияние масел и жиров растительного и животного происхождения на вегетативный рост изученных 5-ти культур *Vac.*



porilliae. Было испытано внесение в среду ср. П 0,1—1%-ного кашалотового жира, персикового, кукурузного, сливочного, подсолнечного, оливкового, касторового, камфорного, кедрового, лавандового масел. Во всех случаях никакой стимуляции роста исследованных культур не было отмечено. Подобный же негативный эффект дало испытание эфиров—Твинов 20, 40, 60, 80.

Учитывая, что наиболее выраженный ростовой эффект был отмечен при использовании трегалозы, нами были проведены более детальные исследования с этим углеводом. Как видно из данных табл. 1, оптимальной концентрацией трегалозы для всех изученных штаммов *Vac. porilliae* является 0,2%. Однако отмечаются немалые различия у отдельных культур. Так, штамм 1885 отличался наиболее выраженным ростом, почти вдвое более интенсивным, чем при применении 0,2%-ной глюкозы. В целом надо отметить, что трегалоза, по сравнению с глюкозой, является более приемлемым источником углеродного питания. Очевидно, при этом, наряду с ростовым действием, она обладает также свойством стабилизировать вегетативные формы *Vac. porilliae*.

В работах ряда авторов [7] показана стимуляция роста *Vac. porilliae* барбитуровой кислотой, причем установлено, что эта кислота не обладает специфическим спорогенным действием [14].

В наших опытах было установлено стимулирующее действие натриевых солей щавелевой, фумаровой и барбитуровой кислот, причем более выраженным являлся эффект аммонийной соли щавелевой кислоты. Однако увеличение титра вегетативных клеток не всегда коррелировало с повышением количества спороподобных включений, трактуемых как «тельца Костилоу». Наибольшее число подобных образований (10—15%) отмечалось при наличии в среде фумаровой кислоты в концентрации 0,5%; при внесении в среду 0,1—0,5%-ной барбитуровой кислоты эти образования составляли 20%.

Таблица 1

Влияние различных концентраций трегалозы на вегетативный рост некоторых культур *Vac. porilliae* (инкубация в среде ср. П при 28°)

Концентрация трегалозы в среде, %	Титр клеток, млн/мл				
	шт. 1883	шт. 1884	шт. 1885	шт. 1886	шт. 1887
1,0	13	29	13	12	16
0,5	10	33	13	13	16
0,2	21	37	16	14	20
0,1	16	19	12	11	12
0,06	7	9	10	7	10
0,02	2	4	7	5	5
Контроль (ср. П с 0,2%-ной глюкозой без трегалозы)	8	20	13	12	13

В опытах с внесением в среду щавелевой кислоты и ее солей увеличение числа телец Костилоу не отмечалось, хотя наблюдалась стимуляция вегетативного роста. Мы считаем, что во всех этих случаях истинные споры, характерные для *Vac. porilliae*, при развитии этих бак-

терий в гемолимфе личинок японского жука на искусственных средах с отмеченными органическими кислотами почти не образуются. Многие другие органические и жирные кислоты (уксусная, лимонная, бензойная, молочная, малеиновая, сульфаниловая, салициловая, борная, янтарная, олеиновая, фталевая, стеариновая, винокамненная и др.), испытанные в наших опытах, на рост и спорообразование культур *Vac. ropilliae* действия не оказывали.

Необходимо отметить, что в наших опытах более выраженное ростовое действие на *Vac. ropilliae* отмечалось при наличии в среде 0,1—0,2%-ной барбитуровой кислоты, а не 1%-ной, как сообщалось другими авторами [7]. Сводные данные опытов с 2-мя культурами, характерные для других изученных штаммов *Vac. ropilliae*, представлены на рис. 1.

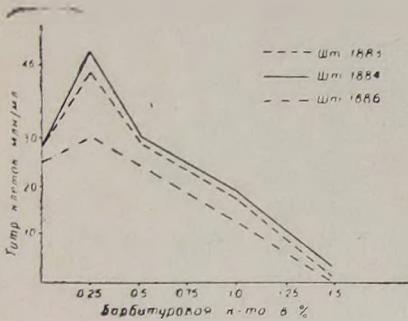


Рис. 1.

Рис. 1. Влияние барбитуровой кислоты на вегетативный рост культур *Vac. ropilliae*.

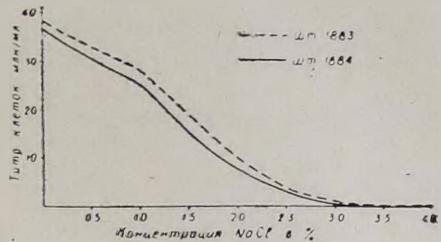


Рис. 2.

Рис. 2. Вегетативный рост культур *Vac. ropilliae* при различных концентрациях поваренной соли на среде ср. П (инкубация 22 ч при 30°).

Мы изучали влияние различных концентраций в среде с NaCl на рост и развитие культур *Vac. ropilliae*, имея в виду указания в литературе о подавлении вегетативного роста этих бактерий при наличии более 1% такой соли [10]. Полученные данные, представленные схематически на рис. 2, указывают, что наличие в среде NaCl нежелательно для роста культур бактерий *Vac. ropilliae*. Все исследованные нами штаммы фактически не развиваются при 3%-ной и более концентрациях поваренной соли. Начиная с 0,1%-ной концентрации и выше постепенно подавляется рост бактерий. Из испытанных штаммов сравнительно более резистентной к содержанию поваренной соли является культура 1887. Учитывая полученные результаты во всех опытах по изучению физиологии питания культур *Vac. ropilliae*, нами использовались питательные среды без добавления поваренной соли.

Исследованиями ряда авторов [6, 11], а также нашими работами [3] было показано, что культура *Vac. ropilliae* при развитии нуждается во многих аминокислотах, а также в биотине и тиамине. Некоторые аминокислоты (серин, треонин, цистин) оказывают ингибирующее действие на рост культур этих бактерий [3]. В этой связи затрудни-

тельно интерпретация данных по аминокислотному питанию бактерий *Vac. ropilliae*, в особенности при использовании их в качестве источников углеродного питания. Особенно трудно это сделать в опытах с природными субстратами.

В процессе наших работ было испытано большое число различных естественных субстратов как источников углеродного, азотного, а также витаминного питания. Наиболее благоприятное действие на вегетативный рост всех испытанных штаммов *Vac. ropilliae* было установлено в опытах с использованием лактальбумина. Сводные данные этих опытов представлены в табл. 2, согласно которой замена гидролизата казеина на лактальбумин заметно снижает интенсивность вегетативного роста бактерий. В то же время можно отметить, что добавление лактальбумина в концентрациях 1,2—1,8% наиболее благоприятно для сравнительно умеренного вегетативного роста культур *Vac. ropilliae*.

Таблица 2
Влияние различных концентраций лактальбумина на вегетативный рост *Vac. ropilliae* (учет роста спустя 24 ч при 30°)

Концентрация лактальбумина, %	Титр клеток, млн/мл				
	шт. 1883	шт. 1884	шт. 1885	шт. 1886	шт. 1887
3,0	4,0	5,2	5,2	5,1	5,2
2,5	7,4	8,0	8,6	7,5	6,2
2,2	9,0	11,0	10,0	8,5	8,4
2,0	9,5	11,0	9,2	8,5	11,7
1,8	12,2	14,6	13,5	13,5	13,0
1,5	14,6	17,5	15,7	16,0	15,0
1,2	12,2	14,0	13,0	12,2	13,0
1,0	8,0	11,7	10,0	9,0	10,0
0,8	7,0	8,5	8,0	7,5	7,0
0,5	4,0	5,2	5,1	5,1	4,4
0,1	0,1	1,7	1,0	1,0	1,2
Контроль (ср. П без лактальбумина)	17,6	38,0	32,0	31,0	33,0

Нами были одновременно проведены специальные опыты по изучению оптимальных исходных показателей реакции среды для роста культур *Vac. ropilliae*. Данные опытов показали, что наиболее благоприятным является исходный рН среды 7,5. Вегетативный рост испытанных штаммов не имеет места при рН ниже 6,5 и выше 8,5. Что касается температуры, то, по данным наших опытов, оптимальной для изученных нами штаммов оказалась температура 30° (рис. 3). Рост культур отмечается

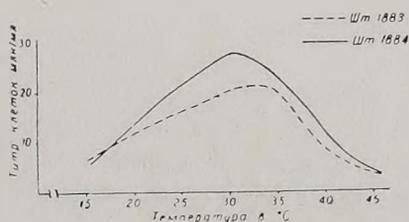


Рис. 3. Вегетативный рост культур *Vac. ropilliae* на среде ср. П при различных температурах.

при 15—40°, вне указанных температурных режимов вегетативный рост *Bac. popilliae* фактически не имеет места.

Большое влияние на рост и развитие клеток *Bac. popilliae* оказывает аэрация среды. Как правило, в условиях глубинного выращивания бактерии этого вида при аэрации среды интенсивно размножаются, в дальнейшем, спустя 18—24 ч, погибая.

В табл. 3 подытожены сводные данные, иллюстрирующие различия в интенсивности развития культур *Bac. popilliae* в глубинных (качалка 220 об/мин) и стационарных условиях выращивания на среде ср. П при 30°.

Таблица 3
Рост культур *Bac. popilliae* в глубинных и стационарных условиях

№№ штаммов	Титр бактерий, млн/мл, спустя					
	24 ч		48 ч		72 ч	
	глубинный рост	покой	глубинный рост	покой	глубинный рост	покой
1883	34	9	35	11	38	13
1884	38	18	39	20	41	21
1885	41	20	42	21	44	22
1886	35	10	37	11	39	12
1887	38	17	40	18	41	20

Данные табл. 3 показывают, что рост и развитие бактерий изученных штаммов фактически прекращается после 24-х часов. Микроскопия препаратов указывает на отсутствие споруляции, обильно выявляются полиморфные клетки, большая часть которых является нежизнеспособной. В этой, равно как и во всех остальных сериях опытов, нам не удалось отметить образования типичных спор и параспоральных включений, которые обнаруживаются при развитии культур *Bac. popilliae* в гемолимфе личинок японского жука.

По-видимому, при росте культур *Bac. popilliae* на используемых питательных средах имеет место установленное нами [4] явление диауксии, и дальнейшие исследования в этой области должны быть направлены на разработку сбалансированных сред с использованием специфических условий культивирования и ростовых факторов.

Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 12.VIII 1980 г.

BACILLUS POPILLIAE ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՇԽԱՏՆԱՅԻՆ ՍՆՆՎԱՌՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ս. Ն. ԲԱԳԻԱՍԱՐՅԱՆ, Զ. Գ. ԱՎԱԴՅԱՆ, Է. Գ. ԱՖՐԻԿՅԱՆ

Փորձարկված նյութերից *Bacillus popilliae* կոկտորանների համար որպես յուրացվող ածխածնի աղբյուր են հանդիսացել գլյուկոզը, ֆրուկտոզը,

լակտոզը, մալտոզը և սախարոզը: Բարբիտուրաթթուն, ֆումարաթթուն և թրթնջկաթթուն խթանիչ ազդեցություն են գործել *Bacillus popilliae* վեղետատիվ աճման վրա, որոշ շահով ավելացնելով նրանց մոտ Կոստիլոուի մարմինների առաջացումը: Փորձարկված սննդամիջավայրերի և սուբստրատների վրա տիպիկ սպորների առաջացում չի նկատվել:

CARBON NUTRITION OF *BACILLUS POPILLIAE*

S. N. BAGDASARIAN, Z. G. AVAKIAN, E. G. AFRIKIAN

Glucose, fructose, lactose, maltose and sucrose are utilisable sources of carbon nutrition for *Bacillus popilliae* cultures among the substrates tested. Barbituric, fumaric and oxalic acids are stimulating action of the vegetative growth of *Bac. popilliae* with some enhancement of Costilow bodies formation. No case of typical spores production on the tested media and substrates has been observed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Африкян Э. К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973.
2. Африкян Э. К. Успехи микробиологии. 10, 142, 1975.
3. Африкян Э. К., Авакян З. Г., Багдасарян С. Н. ДАН АрмССР, 62, 5, 301—304, 1976.
4. Багдасарян С. Н., Эль-Регистан Г. Н., Козлова А. Н., Поплаухина О. Г., Дуда В. И., Африкян Э. К. Микробиология, 46, 5, 954, 1977.
5. Швецова О. И., Зурабова Э. Р. СОНТИ, Микробиология, 1972.
6. Costilow R. N., Sylvester Ch. J., Pepper R. E. Appl. Microbiol., 14, 161, 1966.
7. Coulter W. H., Costilow R. N., Ralph B. Canad. J. Microbiol., 16, 801, 1970.
8. Dutky S. R. In „Insect Pathology“, 2. ed. E. A. Steinhaus, AP, 1963.
9. Faust R. M., Spizizen J., Gage V., Travers R. S. J. Invertebr. Pathol., 33, 2, 233, 1979.
10. Haynes W. C., Weih L. J. J. Invertebr. Pathol., 19, 1, 125, 1972.
11. Lufhy P. Untersuchungen an *Bacillus tribourgensis* Wille. Diss. Nr 4067, Zentrbl. für Bakt., 122, 671, 1968.
12. Sharpe E. S., St. Julian G., Crowell C. Appl. Microbiol., 19, 3, 681, 1970.
13. Sharpe E. S., Bulla L. A. Jr. Appl. a. Environm. Microbiol., 35, 3, 601, 1978.
14. Sylvester C. J., Costilow R. N. J. Bacteriol., 87, 114, 1964.
15. Wyss Ch. Zentrbl. für Bakt. Abt., 11, 126, 5, 461, 1972.