

О ПОЛУЧЕНИИ КУЛЬТУР *BACILLUS POPILLIAE* С ВЫСОКОЙ СПОРОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

С.Н. БАГДАСАРЯН

Республиканский центр депонирования микробов НАН
и Министерства образования и науки РА, 378510, г. Абовян

Показана возможность получения спорогенного штамма *Bacillus popilliae* с использованием метода селекции терморезистентных форм. Дана характеристика морфофизиологических и культуральных особенностей полученного варианта, отличающегося от исходного высокой спорогенностью и жизнеспособностью, на разработанной питательной среде.

Ցույց է տրված *Bacillus popilliae*-ի սպորոգեն շտամի ստացման հնարավորությունը բերմալայուն ձևերի սելեկցիայի եղանակով: Մշակված սննդամիջավայրի վրա ներկայացված է ստացված շտամի մորֆո-ֆիզիոլոգիական և կուլտուրալ առանձնահատկությունների բնութագիրը:

The possibility to obtain a sporogenous strain of *Bacillus popilliae* by selection of thermoresistant forms has been shown. Morpho-physiological and cultural properties of obtained strain on the developed medium have been presented.

Этиопатогенные бактерии - *Bacillus popilliae* - спорообразование

Несмотря на успехи микробиологического метода борьбы с вредоносными насекомыми, до настоящего времени не получены эффективные и перспективные препараты для борьбы с жесткокрылыми, жуками и другими особо опасными вредителями. В этой связи большой интерес представляют культуры *Bacillus popilliae* (BP) - возбудителей молочных болезней японского жука и многих представителей семейства *Scarabaeidae* [6].

Бактерии BP начали применяться как средство микробиологической борьбы уже со времени их описания [7-9]. Однако до настоящего времени подобные препараты продолжают выпускаться трудоемким способом - культивированием в организме восприимчивых насекомых. На протяжении более 50 лет изучены многие вопросы этиопатогенеза болезней и биохимические изменения в ходе развития инфекционного процесса [10, 14, 15], а также культуральные, физиолого-биохимические особенности BP [2-5].

Нами разработана искусственная среда для эффективного выращивания вегетативного BP [1]. Вместе с тем основная задача - разработка условий споруляции на искусственных питательных средах - осталась нерешенной, что является главным препятствием для промышленной выработки инсектицидных препаратов на основе культур этого вида.

Данная работа ставила целью получение и характеристику культур - возбудителей молочных болезней японского жука с высокой спорогенной активностью в условиях развития *in vitro*.

Материал и методика. Объектом исследования служили культуры *BP* штаммы ИНМИА-1883, 1884, 1885, 1886, 1887 из коллекции Республиканского центра депонирования микробов.

Для выращивания культур использовали жидкую и агаризованную питательные среды Ср-Па, разработанные и предложенные в лаборатории спорообразующих бактерий ИНМИА НАН Армении. В качестве исходной культуры использовали шт. ИНМИА 1884, выращенный на агаризованной среде Ср-Па и течение 15 суток при 30°. Термообработке подвергали суспензию указанного штамма в жидкой среде Ср-Па при 60° в течение 10 мин на водяной бане со слабым перемешиванием. В результате расова из суспензии на агаризованную среду и микроскопирования всех полученных колоний спустя 15 дней роста при 30° отбирался вариант с максимальным спорообразованием для последующей термообработки. Окончательный отбор спорогенного варианта производился после трехкратной обработки суспензии спорогенных вариантов при тех же условиях.

Титр клеток определяли на ФЭК-56 при 560 нм, в кюветках с толщиной слоя 0,5 см. Учет спорообразования проводили микроскопированием колоний, выросших на агаризованной среде Ср-Па на 15 сутки инкубации при 30°. Физиолого-биохимические свойства изучали в соответствии с ключом для идентификации бактерий.

Результаты и обсуждение. Литературные данные указывают, что в результате многочисленных работ по получению спорогенных культур *BP* с использованием методов экспериментальной изменчивости, внесением в среду различных добавок, стимулирующих спорообразование (мочевина, барбитуровая кислота, вытяжка из старых культур *BP*, активированный уголь и др.) была достигнута максимальная споруляция в пределах 20% [12, 14, 16, 17].

Представлены данные по получению спорогенного варианта *BP* с использованием метода термообработки и селекции терморезистентных форм.

В результате микроскопирования всех колоний, полученных после расова суспензии клеток, подверженных термообработке, было выявлено, что большинство колоний были представлены вариантами, образующими 40% спор и 10-20% телец Кистилоу (ТК), трактуемых как формы преспор или начальные этапы формирования спор. Частота получения спорогенных вариантов составляла 6-7%. Максимальное спорообразование терморезистентных вариантов, полученных после 3 термообработок по стадиям обработки составляло 40, 60 и 80%, соответственно.

Отмечена активация прорастания спор термообработкой, что согласуется с данными других авторов [13]. При использовании одинакового количества суспензии с титром 1×10^5 кл/мл после термообработки количество выросших колоний составляло 40% против 25-30% в контрольном варианте без термообработки.

В табл.1 представлены данные о росте и спорообразовании культур *BP* и полученного спорогенного варианта шт.1884Т.

Полученный вариант отличается способностью накапливать максимальный титр вегетативных клеток - 68-70 млн/мл, что более чем в два раза превышает титр исходного и других штаммов *BP*, имеющихся в нашей коллекции. Спустя 12 дней роста на агаризованной среде Ср-Па выделенный штамм продуцировал 80-85% спор и 10-20% ТК. Микроскопия 12 суточных колоний всех исследованных штаммов выявила большое число лизированных клеток и протопластов.

Таблица 1. Сравнительная характеристика роста и спорообразования различных культур *Bacillus popilliae*

(Питательная среда Ср-ПА; спорогенность - данные микроскопии спустя 12 дней)

Штаммы	Титр клеток, млн/мл, спустя 22ч	Спорогенность, %	
		Споры	ТК
1883	32	30-40	20
1885	30	30	10-15
1886	29	30	20
1887	31	30	30
1884	33	40	10
1884Т (термомутант шт.1884)	68	80-85	10-20

Все штаммы сохраняли жизнеспособность в условиях хранения на агаризованной среде Ср-Па при +5 - +8° до 25 суток. Штамм 1884Т, в отличие от исходного штамма, обеспечивал высокую жизнеспособность до 5 месяцев хранения в аналогичных условиях. Предельный срок хранения указанного штамма 10 месяцев.

По культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам полученный вариант идентичен с исходным штаммом. Исключение составляет наличие каталазы - спорогенный вариант интенсивно продуцирует каталазу, что согласуется с сообщениями некоторых авторов о получении спорогенных вариантов с каталазной активностью [11].

Спорогенный вариант *BP* шт. 1884 Т хранится в коллекции РЦДМ в виде мазков спор на предметном стекле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян З.Г., Багдасарян С.Н., Африкян Э.К. АС СССР N 922139, 1981.
2. Багдасарян С.Н., Африкян Э.К. Биолог. журн. Армении 37, 4, 335-339, 1984.
3. Багдасарян С.Н. Автореф. канд. дисс., Киев, 1986.
4. Black S.H. J. Invert. Pathol., 12, 148-157, 1968.
5. Bulla L.A., Rhodes R.A., Oulian G. St. Ann. Rev. Microbiol., 29, 168-191, 1975.
6. Dutky S.R. J. Agr. Res., 61, 57-68, 1940.
7. Dutky S.R. US Patent N 2258319, 1941.
8. Dutky S.R., Fest W.C. US Patent N 2270804, 1942.
9. Dutky S.R. US Patent N 2293890, 1943.
10. Dutky S.R. J. Insect. Pathol., 2, 75-115, 1963.
11. Haynes W.C., Rhodes L.J. J. Bacteriol., 91, 6, 2270-2274, 1966.
12. Haynes W.C., Weih L.Y., Crowell C. Can. J. Appl. Microbiol., 19, 4, 515-518, 1970.
13. Julian G.St., Hall H.H. J. Invert. Pathol., 15, 2, 240-246, 1970.
14. Lüthy P. Zentrbl. für Bact., 122, 671-711, 1968.
15. Rhodes R.A. Bacteriol. Rev., 29, 373-381, 1965.
16. Sharpe E.S., Julian G.St., Crowell C. Can. J. Appl. Microbiol., 19, 4, 681-688, 1970.
17. Sharpe E.S., Bulla L.A. J. Invert. Pathol., 30, 2, 242-248, 1977.

Получена 15.V.1997