

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVIII, 9

SECTIO C

1973

Instytut Biologii UMCS  
Zakład Fizjologii Roślin

Jan JAROSZ

**Niektóre bakterie jelitowe izolowane z larw mola woskowego  
(*Galleria mellonella* L.)**

Некоторые кишечные бактерии, изолированные из личинок *Galleria mellonella* L.

Some Intestinal Bacteria Isolated from Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella* L.)

Zagadnienie flory bakteryjnej przewodu pokarmowego larw mola woskowego było tematem niewielu prac (2, 3, 5, 8). Mol woskowy jest jednym z nielicznych organizmów zdolnych do wykorzystywania wosku pszczelego (palamitynianu mirycylowego) jako źródła energii. Wraz z woszczyną pszczelą, która stanowi główny pokarm larwy, mogą wnikać do jej wnętrza liczne drobnoustroje. Należy przypuszczać, że w procesie trawienia wosku uczestniczą mikroorganizmy żyjące w przewodzie pokarmowym larwy (6).

W pracy niniejszej określono przynależność systematyczną kilku szczepów bakteryjnych wyosobnionych z przewodu pokarmowego larwy *G. mellonella* L. przez Barbarę Dudziak. W odróżnieniu od innych szczepy te cechuje silne działanie antybiotyczne o spektrum skierowanym przeciw drobnoustrojom gram-dodatnim i prątkom kwasoopornym.

WYNIKI

Badaniami taksonomicznymi objęto 8 szczepów: 5AK, 8, 15, 26a, 26b, 53, 74 i 92.

Morfologia mikroskopowa. Szczepy badane są gram-dodatnie, pałeczkowate, ruchliwe, tworzą zarodniki, tlenowce. Wykazują więc cechy typowe dla laseczek zarodnikujących z rodzaju *Bacillus*. Zespół cech morfologii mikroskopowej zestawiono w tab. 1.

Tab. 1. Morfologia mikroskopowa  
Microscopic morphology

Szczep Strain	8	15, 74, 92	5AK, 53	26a	26b
Formy wegeta- tywne Rods	gram-dodatnie, jednolicie wybarwione, ruchliwe, układające się niecharakterystycznie laseczki gram-positive, uniformly stained, mobile, rods	0,8×2,5 μ, pojedyncze, 0,7×3,0 μ, zwykle wystę- niekiedy w krótkich pają w krótkich łańcusz- łańcuszkach, głównie kach, rzadko pojedyncze szczep 15 usually in short chains, single, sometimes in rarely single short chains, mainly tangled chains strain 15	0,7×3,0 μ, zwy- kle tworzą dłu- gie, poplątane łańcuchy usually in long tangled chains	0,7×2,1 μ, końce nieco zaokrąglo- ne, występują po- jedynczo lub pa- rami of poorly rounded ends, single or in pairs	
Sporangia Sporangia	nie nabrzmiate, wy- barwione dwubieguno- wo not swollen, bipolarly stained	niewyraźnie nabrzmiate, wybarwione dwubiegunowo not definitely swollen, bipolarly stained			nieznacznie na- brzmiate slightly swollen if at all
Spory Spores	1,0×1,5 μ, cylindrycz- ne, ułożone centralnie, tworzą się obficie po 18 godz. inkubacji cylindrical, central, many formed 18 hrs after incubation	wymiary spor: spore size: 0,8×1,5 μ	wymiary spor: spore size: 0,7×1,3 μ	0,8×1,3 μ, elipso- idalne, ułożone subterminalnie ellipsoidal, sub- terminal	

Morfologia makroskopowa (charakterystyka hodowli). Agar odżywczy stanowił dla badanych szczepów podłoże optymalne. Na żelatynie szczepy chromogenne 5AK, 15, 74 i 92 wytwarzały rdzawo-fioletowy, a szczep 26a rdzawoczerwony barwnik. Barwniki dyfundowały do podłoża. W odróżnieniu od pozostałych szczep 26b nie wykazywał wzrostu na podłożu z ziemniakiem. Szczepy 5AK, 15, 26a, 53 i 92 rosły w bulionie odżywczym jako hodowla tlenowa z wytworzeniem na powierzchni podłoża grubego, mocno pofałdowanego, zwartego, woskowego, brudnobiałego (w przypadku szczepu 26a rdzawoczerwonego) kożucha, z trudnością ulegającego rozbiciu na jednolitą zawieszinę. Kruchy kożuszek formowany przez szczep 74 był łatwo zawieszalny w płynie fizjologicznym. Szczep 26b powodował jednolite zmętnienie bulionu (wzrost dyfuzyjny) z wytworzeniem ziarnistego osadu, natomiast szczep 8 tworzył na powierzchni podłoża delikatną, białawą błonkę, wypelzającą na ścianki probówki, nie powodował zmętnienia bulionu.

Tab. 2. Zdolności fermentacyjne wyisobnionych szczepów  
Fermentation properties of the isolated strains

Substrat Substrate	Numery kolejne szczepów No. of strains		
	rozkładających substrat decomposing the substrate		nie rozkładających substratu not decomposing the substrate
	szybko (+++) quickly (+++)	powoli (+) slowly (+)	
Sacharoza Saccharose	5AK, 8, 15, 26a, 26b, 53, 74, 92	—	—
Glukoza Glucose	5AK, 8, 15, 26a, 26b, 53, 74, 92	—	—
Laktoza Lactose	—	—	5AK, 8, 15, 26a, 26b, 53, 74, 92
Arabinoza Arabinose	5AK, 15, 26a, 26b, 53, 92	74	8
Ksyloza Xylose	15, 53, 92	5AK, 26a, 26b, 74	8
Glicerol Glycerol	8, 26a, 74, 92	5AK, 15, 26b, 53, 74, 92	—
Mannitol Mannitol	15, 26a, 26b, 53, 92	5AK, 8, 74	—
Salicyn Salicin	8, 26a, 26b, 53, 92	5AK, 15, 74	—

Na agarze odżywczym szczepy 5AK, 15, 26a, 53 i 92 rosły w postaci szorstkich, nieregularnych, woskowych, warstwowo ułożonych kolonii. Na brzegach brudnobiałych kolonii widoczne były charakterystyczne śluzowate brodawki. Nieznacznie rozciągnięte o odcieniu rdzawoczerwonym kolonie szczepu 26a, który nie tworzył brodawek, posiadały szeroki margines koloru sinego. Kolonie szczepu 74 były gładkie, miękkie, cienko rozłożone i regularne. Rozległe, szorstkie, płasko rozłożone, nieregularne, białawe z charakterystycznym użyłkowaniem kolonie szczepu 8 w miarę starzenia przybierały odcień żółtawy. Nie przylegający do agaru szczep 26b rósł w postaci mlecznobiałych, oślizgłych, gładkich, zwartych i kolistych kolonii.

Nieznacznie rozpełzające szczepy 5AK, 15, 26a, 53 i 92 dawały na skosach agarowych wzrost skórzasty, mocno przylegający do agaru. Obfity i mocno rozciągnięty wzrost szczepów 8 i 26b nie był wrośnięty w agar.

**Właściwości fizjologiczne i biochemiczne.** Szczepy rosły zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w 37°C. Optymalna temperatura wzrostu dla szczepu 26b wynosiła 23—34°C, dla pozostałych 32—37°C. Optymalna kwasowość pH 6,5—8,0, wzrost szczepu 26b był hamowany poniżej pH 6,0. Skąpy wzrost szczepów obserwowano w bulionie odżywcym z glukozą w warunkach beztlenowych.

Szczep 8 powodował energiczne upłynnienie żelatyny, workowate rozrzedzenie z wytworzeniem na powierzchni upłynnionej żelatyny błonki stwierdzono w przypadku szczepów 5AK, 15, 26a, 53, 74 i 92, natomiast szczep 26b nie wytwarzał żelatynazy.

Gwałtowną peptonizację mleka bez uprzedniej koagulacji stwierdzono w przypadku szczepu 8, powolną peptonizację bez kwasowego skrzepu powodował szczep 26a, w przypadku szczepów 5AK, 15, 53, 74 i 92 obserwowano najpierw nieznaczną koagulację związaną z zakwaszeniem mleka, a następnie stopniowo postępujące przejaśnienie podłoża na skutek peptonizacji kazeiny. Szczep 26b nie powodował zmian w mleku lakmusowym, cechowały go słabe zdolności proteolityczne.

Badane szczepy fermentowały znaczną ilość węglowodanów i alkoholi wyższych z wytworzeniem kwasu bez gazu. W bulionie odżywcym z glukozą szczepy 5AK, 8, 15, 26a, 53, 74 i 92 po wstępnym zakwaszeniu do pH około 5,0 powodowały silną alkalizację podłoża; w 7 dniu inkubacji kwasowość osiągała wartość pH 8,5—9,0.

Fermentację węglowodanów, rozkład alkoholi wyższych zestawiono w tab. 2, pozostałe właściwości biochemiczne przedstawiono w tab. 3.

Szczepy bakteryjne 5AK, 15, 26a, 53, 74 i 92 zaliczono do *B. subtilis*, szczep 8 zidentyfikowano jako wariant *B. cereus*, szczep 26b wykazywał wiele cech wspólnych z *B. lentus* (1).

Tab. 3. Własności biochemiczne i fizjologiczne szczepów  
 Biochemical and physiological properties of strains

Odczyn Reaction	Numery szczepów dających odczyn No. of strains giving reactions		
	dodatni positive	dodatni opó- niony positive retarded	ujemny negative
Odczyn Voges-Proskauera Voges-Proskauer reaction	5AK, 8, 15, 26a, 53, 74, 92	—	26b
Redukcja NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> —NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> —NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> reduction	5AK, 8, 15, 26a, 53, 74, 92	—	26b
Wytwarzanie ureazy Urease production	26a, 26b	5AK, 8, 15, 53, 74, 92	—
Rozkład skrobi (amylaza) Starch hydrolysis (amylase)	5AK, 15, 26a, 26b, 53, 74, 92	8	—
Hemoliza krwinek końskich Hemolysis of horse blood	5AK, 8	—	15, 26a, 26b, 53, 74, 92
Cytrynian sodu Sodium citrate	26a, 53	5AK, 8, 15, 74, 92	26b
Bulion odżywczy 4% NaCl NaCl broth 4%	5AK, 8, 15, 26a, 53, 74, 92	26b	—
Bulion odżywczy 5% NaCl NaCl broth 5%	5AK, 8, 15, 26a, 53, 74, 92	26b	—
Bulion odżywczy 7% NaCl NaCl broth 7%	5AK, 15, 53, 74, 92	8, 26a	26b

#### DYSKUSJA

Flora autochtoniczna jest w pewnych granicach stała. Zależy w nieznacznym stopniu od warunków bytowania i stadium rozwojowego owada (jajo, larwa, poczwarka, imago). Steinhaus wymienia 38 szczepów wydzielonych z *G. mellonella* L. należących do 19 rodzajów (7). Hemolityczna odmiana pałeczki siennej *Bacterium subtilis* var. *galleriae*, opisana przez Chorine (5), w odróżnieniu od szczepów 5AK, 15, 26a, 53, 74 i 92, oznaczonych w niniejszej pracy jako *B. subtilis*, była koagulazo-dodatnia, nie fermentowała sacharozy. Ze względu na wytwarzanie krystalicznej endotoksyny *B. subtilis* i *B. cereus* znane są jako pospolite entomopatogeny owadów (4). W odróżnieniu od nich *B. lentus* nie był dotychczas izolowany z larw mola woskowego.

Jedynym organizmem stale zamieszkującym przewód pokarmowy mola woskowego okazał się — wg Buchera i Williamsa — *Streptococcus*

*faecalis* (2). Mikroorganizm ten przeżywał okres metamorfozy *G. mellonella* L. i był normalnie przekazywany następnym generacjom (3). Stephens uznał natomiast szczep *S. faecalis* za patogeniczny dla larw mola woskowego (8).

#### PIŚMIENNICTWO

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore 1957.
2. Bucher G. E., Williams R.: The Microbial Flora of Laboratory Cultures of the Greater Wax Moth and its Effect on Rearing Parasites. *J. Invert. Pathol.* 9, 467—473 (1967).
3. Bucher G. E.: Survival of Population of *Str. faecalis* Andrewes and Horder in the Gut of *Galleria mellonella* (Linnaeus) During Metamorphosis, and Transmission of the Bacteria to the Filial Generation of the Host. *J. Insect Pathol.* 5, 336—343 (1963).
4. Cameron R. G.: Inflammation in the Caterpillars of *Lepidoptera*. *J. Pathol. Bact.* 38, 441—446 (1934).
5. Chorine V.: Les microbes pathogènes de *Galleria mellonella*. *Ann. Inst. Pasteur* 41, 1114—1124 (1927).
6. Rybicki M.: Udział mikroflory jelitowej w procesach odżywiania larw mola woskowego. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska sectio C* 8, 15—67 (1953).
7. Steinhaus E. A.: *Insect Microbiology*. New York 1946.
8. Stephens J. M.: A Strain of *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder Producing Mortality in Larvae of *Galleria mellonella* (Linnaeus). *J. Insect Pathol.* 4, 267—268 (1962).

#### РЕЗЮМЕ

8 бактериальных штаммов, которые в отличие от других изолированных из кишечной флоры личинок *Galleria mellonella* L. характеризовались сильным антибиотическим действием, зачислено в род *Bacillus*. Штаммы 5 АК, 15, 26 а, 53, 74 и 92 идентифицированы как *B. subtilis*, Штамм 8 приняли за вариант *B. cereus*. Штамм 26 б, значительно отличающийся морфологическими чертами и биохимическими свойствами, имеет много общих черт с *B. lentus*.

#### SUMMARY

Eight bacterial strains which, contrary to other strains isolated from the intestinal flora of wax moth larvae, showing a high antibiotic activity were included into the genus *Bacillus*. The strains 5AK, 15, 26a, 53, 74 and 92 were identified as *B. subtilis*, whereas the strain 8 as a variant of *B. cereus*. The strain 26b, differing in morphological features and particularly in biochemical properties, had many features in common with *B. lentus*.