

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA
LUBLIN - POLONIA

VOL. VIII. 2

SECTIO C

10.XI.1952

Z Zakładu Fizjologii Roślin i Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego

Kierownik: prof. dr Kazimierz Basalik

i

Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Wydziału Biologii i Nauki o Ziemi

Kierownik: prof. dr Władysław Kunicki

Marian RYBICKI

**Udział mikroflory jelitowej w procesach odżywiania
larw mola woskowego *Galleria mellonella* L.**

**Участие микрофлоры кишечника в процессах
питания личинок восковой моли**

**The participation of the intestinal microflora
in the nourishing processes of larvae of *Galleria mellonella* L.**

Larwy mola woskowego *Galleria mellonella* przedstawiają pod wieloma względami ciekawy obiekt badania. W odróżnieniu od większości larw motyli, których pokarmem są rośliny, larwy mola woskowego odżywiają się woszczyną pszczelej. Ze względu na specyficzny pokarm, którym się odżywiają, były one przedmiotem licznych badań. Mimo wielu prób dokonanych nad odżywianiem się larw mola, problem ten nie został dotychczas rozwiązany.

Przyczyną tego, jak należy sądzić, jest w pierwszym rzędzie skomplikowana budowa — pod względem chemicznym — woszczyny, jako wydzieliny o charakterze lipidowym. Sprawę składu chemicznego woszczyny pszczelej komplikuje fakt, że jest ona przez długi czas podłożem, w którym przechodzą swój rozwój czerwie pszczoł oraz miejscem składania zapasów miodu. Jej skład chemiczny ulega wielkim zmianom zarówno ilościowym jak i jakościowym, wskutek gromadzenia się w niej produktów przemiany materii czerwia pszczelego. Można z dużym prawdopodobieństwem twierdzić, że nie ma dwóch plastrów woszczyny o identycznym składzie chemicznym. Wybitne różnice w składzie chemicznym występują nawet w obrębie jednego plastra, zależnie od tego czy mamy do czynienia z komórkami, w których przeszły swój rozwój czerwie robotnic, trutniów czy też królowej (porównaj w części doświadczalnej tabelę Nr 1).

Niewłaściwie używana w literaturze nomenklatura wosku i woszczyny, wymaga ustalenia tych pojęć. W pracy niniejszej mianem wosku określano substancję chemicznie oznaczoną jako ester miryicylo-palmitynowy, mianem zaś woszczyny określano mieszaninę substancji o charakterze lipidowym, zawierającą alkohole

o długich łańcuchach, wyższe kwasy tłuszczowe, estry alkoholi i wyższych kwasów tłuszczowych, węglowodory nasycone i nienasycone (Gascard, Damoy (8), Damoy (2), Chibnall A. C., Piper S. H., Pollard A., Williams E. F., and Sahai P. N. (1)), oraz produkty przemiany materii czerwca pszczelego (błony komórek larw pszczelich). Do wymienionych wyżej a poznanych dotychczas składników starej woszczyzny pszczelej należy jeszcze dodać barwiki. Pochodzą one w pierwszym rzędzie z pyłku kwiatowego; dominujące znaczenie ma tutaj 1, 3- dwuhydroksylawon a głównym źródłem tego barwika jest pyłek roślin takich jak: *Reseda luteola*, *Calluna vulgaris*, *Apium petroselinum*, *Populus nigra* (Jaubert G.F. (9)). Analizą chromatograficzną wykryto luteinę, ester luteiny, oraz 1,28% karotenoidów (Tiescher J. (17)).

Zasadniczym problemem, któremu poświęcono dotychczas najwięcej prac, była kwestia spożywania i zużycia przez larwę mola wosku, jako substancji nietrawionej przez żadne dotychczas znane zwierzę. Początkowo uważano, że wosk jest niezbędnym i głównym składnikiem diety larwy. Pierwsze wyniki hodowli otrzymane przez Dönhoff'a (4) wykazały, że pokarmem, na którym żerowały larwy mola i wydały motyle, była mieszanina wosku i pyłku kwiatowego; hodowla larw prowadzona oddzielnie na czystym wosku i oddzielnie na samym pyłku dała wyniki negatywne. Brak danych w pracy tego autora odnośnie warunków hodowli, wieku i wagi larw użytych do hodowli, może nasuwać pewne wątpliwości co do wyników hodowli.

W toku dalszych badań stwierdzono, że pewna ilość wosku jako estru kwasu palmitynowego i alkoholu mirycylowego znika po przejściu przez przewód pokarmowy larwy. Nasunęło to przypuszczenie, że w przewodzie pokarmowym larwy mola istnieje enzym zdolny do hydrolizy palmitynianu mirycylowego. Ilościowe prace w tym zakresie podjął pierwszy Pertzoff (13). Autor ten, stosując miareczkowanie w roztworze alkoholowym, stwierdził zwiększenie kwasowości w tych próbach, w których znajdował się wyciąg enzymatyczny (suche roztarte na proszek larwy) i wosk w porównaniu z próbkami kontrolnymi, w których wyciąg enzymatyczny został podgrzany do 100°C. Zwiększenie kwasowości przypisuje Pertzoff uwolnieniu grup karboksylowych kwasu, wchodzącego w skład wosku. W wyniku doświadczeń autor dochodzi do wniosku, że larwy mola woskowego zawierają enzym—czerazę.

Fakt zużywania wosku przez larwę mola, został potwierdzony w pracach późniejszych przez innych autorów. Dickman (3) umieszczając larwy w naczyniach zawierających oznaczone ilości czystego wosku hodował je tam aż do otrzymania motyli. Po usunięciu wydaliny owadów oznaczał ilość wosku pozostałego. W tych warunkach doświadczenia stwierdził on spożycie wosku przez larwy w ilości 50% w stosunku do ilości podanej.

Doświadczenia wymienionych wyżej autorów wykazały, że larwy mola spożywają wosk, ale nie wiadomo było w jakiej ilości zużywane są poszczególne jego składniki. W podjętych następnie w tym kierunku pracach mianem wosku określano frakcję lipidową woszczyzny pszczelej tj. wosk jako ester mirycylo-palmitynowy, alkohole o długich łańcuchach, wolne wyższe kwasy tłuszczowe, węglowodory nasycone i nienasycone. Poszczególne składniki wchodzące w skład frakcji lipidowej „wosku“ nie są zużywane przez larwę w jednakowym stopniu, bowiem „wosk“

wydalin różni się od „wosku” spożywanego niższą wartością liczby kwasowej i estrowej oraz nieznaczną wyższą procentową substancji niezmydlających się (Duspiva (5)). Ta nieznaczną wyższą procentową w wydalinach substancji niezmydlających się jest wynikiem zużywania przez larwy substancji zmydlających się i alkoholi, a nie zużywania węglowodorów. Zatem z całej frakcji lipidowej, według Duspiva (5) zużywane są częściowo kwasy tłuszczowe, estry i alkohole a nienaruszone pozostają węglowodory.

Niemierko (12) stwierdził różny stopień zużycia poszczególnych kwasów wchodzących w skład „wosku”. Z ogólnej ilości spożytych przez larwy kwasów tłuszczowych 43% zostaje wydalone, 14% zatrzymane, a 43% utlenione. Z ogólnej zaś ilości spożytych przez larwy substancji niezmydlających się zostaje wydalone 47%, zatrzymane przez organizm tylko 2%, a utlenionych 53%. W czasie wzrostu larw stwierdzono kumulację tłuszczów; wzrost kwasów tłuszczowych dochodzi od 18 do 43% suchej substancji, wśród nich od 7 do 14% stanowią kwasy nasycone, zaś nienasycone od 11 do 29%.

Badania nad poszukiwaniem enzymu cerazy zostały ponownie podjęte przez Krauta i współpracowników (10), którzy stosowali ten sam sposób otrzymywania wyciągu enzymatycznego co i Pertzoff (wyciąg glicerynowy z rozartych na proszek i uprzednio dokładnie wysuszonych larw mola). Autorzy ci stwierdzili, że wprawdzie w próbkach nie poddanych działaniu wyższej temperatury zachodziły procesy enzymatyczne, ale były to — jak przypuszczają — procesy natury proteolitycznej lub glikolitycznej powodujące podniesienie się stopnia kwasowości. Drugą przyczynę wzrostu kwasowości autorzy widzą w procesach rozkładu bakteryjnego, którego trudno uniknąć w tych warunkach. Z wyniku doświadczeń autorzy dochodzą do wniosku, że u larw mola woskowego nie występuje wolny enzym hydrolizujący czysty wosk (ester mirycylo-palmitynowy). Do takiego samego wniosku dochodzi Duspiva (5).

Negatywne wyniki doświadczeń nad poszukiwaniem obecności w larwach enzymu rozkładającego czysty wosk, a jednocześnie stwierdzenie mniejszej zawartości wosku w wydalinach w porównaniu z ilością spożytą przez larwy, nasunęło podejrzenie hydrolizy tego estru przez mikroflorę jelitową.

Przypuszczenia o udziale mikroflory w procesach hydrolizy wosku w przewodzie pokarmowym larwy zostały częściowo potwierdzone w pracy Dickmana (3). W wyniku serii doświadczeń przeprowadzonych przez tego autora połączonych z wyizolowaniem bakterii z treści jelita larwy stwierdzono, że niektóre wyizolowane przez niego bakterie zmieniały do pewnego stopnia wosk zarówno co do ilości jak i konsystencji. Zmianie wosku towarzyszyło nieznaczne obniżenie pH i bardzo słaby — ale możliwy do zmiareczkowania — wzrost kwasowości. W rezultacie autor przypuszcza, że prawdopodobnie mikroorganizmy jelitowe pełnią przy najmniej pośrednią funkcję w trawieniu wosku, produkując substancje pośrednie, trawione przez larwy.

Z przeglądu dotychczasowych prac wynika, że zagadnieniem, któremu poświęcono najwięcej uwagi była kwestia strawialności i zużycia przez larwy mola wosku. Specyficzny charakter pokarmu jakim odżywiają się larwy mola sprawia, że zagadnienie trawienia i zużycia przez zwierzę jednego ze składników (wosku) nie może być rozpatrywane bez jednoczesnego badania zużycia i zapotrzebowania przez

zwierzę innych składników, a mianowicie związków azotowych. Ogólnie możnaby powiedzieć, że prawie wszystkie cytowane prace poświęcono rozwiązywaniu zagadnienia spożycia i zużycia w różnym stopniu przez larwy mola związków o charakterze tłuszczowym. Zagadnieniem jednak bardzo ważnym i trudnym, a któremu poświęcono dotychczas najmniej pracy, jest sprawa zapotrzebowania i zużycia przez larwy związków azotowych.

Z doświadczeń hodowlanych przeprowadzonych przez Dönhoffa (4) wynikałoby, że źródłem azotu dla larw przez niego hodowanych jest pyłek kwiatowy. Obserwacje zmian jakie zachodzą w plastrach woszczyny w miarę używania jej przez pszczoły jako miejsca rozwoju czerwia wskazują, że komórki plastra w zależności od ilości wyhodowanych w nich pokoleń czerwia pszczelego stają się coraz mniejsze, a biały kolor woszczyny świeżo sporządzonej zmienia się poprzez wszystkie odcienie żółtej, brązowej aż prawie do czarnej.

Czynnikiem powodującym zmniejszenie się komórek pszczelich są „błony” ułożone warstwami. Świeżo sporządzony biały plaster woszczyny, w którym nie przeszły rozwoju czerwie pszczoł posiada ściśle określone wymiary i składa się prawie całkowicie z substancji o charakterze lipidowym (patrz część doświadczalna tabela 1). W miarę używania plastra przez pszczoły jako miejsca rozwoju czerwia pszczelego, maleje procentowa zawartość frakcji lipidowej, a pojawia się w nim natomiast pewien procent substancji suchej, nierozpuszczalnej w rozpuszczalnikach lipidowych.

W rezultacie rozwoju czerwia pszczelego, w komórkach utworzonych przez pszczoły z substancji lipidowych, gromadzi się zatem jakiś składnik, który jako „błona” wyściela całą komórkę plastra. Po ekstrakcji komórek z plastra starego, w którym przeszło rozwój kilka pokoleń czerwia pszczelego, można pensetą rozdzielać poszczególne warstwy „błon”.

Badania nad znaczeniem wosku i frakcji nierozpuszczalnej w rozpuszczalnikach lipidowych dla larw mola prowadził Me^talnikow (11).

Z doświadczeń jego wynika, że:

1-o wosk rozumiany jako ester mirycylo-palmitynowy jest niezbędnym składnikiem diety larwy, bowiem rezultatem zmetabolizowania tego składnika jest wytworzenie wody niezbędnej do utrzymania przy życiu larw mola;

2-o źródłem azotu dla larw mola jest frakcja nierozpuszczalna w rozpuszczalnikach lipidowych, na której larwy w warunkach hodowlanych mogą się rozwijać tylko w tym wypadku, jeżeli jest zwilżona wodą. Larwy mola hodowane na czystym wosku swoje zapotrzebowanie na azot pokrywają przez pożeranie innych larw.

W oparciu o spostrzeżenia i wyniki badań cytowanych autorów należy przewidywać, że hodowla larw mola przeprowadzona w warunkach jałowych pozwoliłaby ustalić, jakie procesy fizjologiczne należą do działalności larwy, a jakie do flory bakteryjnej.

Pierwszej i jedynej próby hodowli jałowej tego owada dokonał Wollman (18). Doświadczenie polegało na wyjałowieniu woszczyny starej w temperaturze 120°C, a następnie hodowla na tak wyjałowionym podłożu larw od jaj wyjaławianych sublimatem. W rezultacie autor podaje, że otrzymał 6 pokoleń jałowych mola woskowego.

Spostrzeżenia Krauta i współpracowników (10) odnośnie dużej ilości bakterii w jelicie larw, przypisywanie przez Dickmana (3) florze jelitowej pośredniego udziału w procesach trawienia wosku, pokrywanie przez larwy zapotrzebowania na azot przez spożywanie „blon” komórek pszczelich oraz pożeranie się wzajemnie larw przy karmieniu czystym woskiem (Metalnikow 11), brak dokładniejszych danych w pracy Wolimana (18) w zakresie rozwoju larw w warunkach jałowych, zwróciły uwagę na zagadnienie udziału mikroflory jelitowej w procesach odżywiania larw mola woskowego.

Metodyka

Obiektem doświadczalnym były wszystkie stadia rozwojowe mola woskowego — *Galleria mellonella* L.

Pierwsze larwy wraz z poczwarkami pochodziły z okolic Warszawy. W tym samym miejscu skąd pochodziły pierwsze larwy, hodowano dla potrzeb niniejszych badań pszczoły w 12 ulach. Przez cały czas pracy, z tych tylko uli pobierano woszczynę pszczelą, która służyła jako pokarm dla larw. Nadmienić należy, że woszczyna używana w przeprowadzonych doświadczeniach nie posiadała węzy a była całkowicie sporządzona przez pszczoły, których nie dokarmiano cukrem. Pszczoły te odżywiały się wyłącznie zebrany przez siebie pyłkiem i nektarem.

Do hodowli jałowych larw mola używano woszczyny jałowej. Wyjaławianie jej stanowiło jeden z trudniejszych etapów tej pracy. Początkowo zastosowano pasteuryzację. W toku dalszej pracy okazało się, że woszczyna pasteuryzowana nie jest jałowa, posiewy kontrolne dokonywane w czasie trwania hodowli wykazały obecność bakterii.

Zastosowano wówczas inny sposób wyjaławiania. W erlenmeyerce pojemności 300 ml. umieszczano drobne kawałki woszczyny starej ciemno brązowej, zamykano korkiem z waty i autoklawowano w ciągu 1,5 godz. pod ciśnieniem 2,5 atm. Należało się liczyć z tym, że wprowadzie wyjaławianie w tych warunkach może powodować zmiany nie tylko w strukturze woszczyny, ale i zmiany chemiczne, to jednak zastosowano ten sposób na podstawie wyników hodowli larw w warunkach nie jałowych na woszczynie zupełnie zmienionej pod względem chemicznym i fizycznym (patrz część doświadczalna: Hodowle E i F). Posiewy kontrolne trzykrotnie w ten sposób wyjaławianej, a następnie inkubowanej woszczyny wykazały całkowitą jej jałowość. Jałowa również okazała się ona w czasie przeprowadzanych z nią doświadczeń.

Jako środków bakteriobójczych używano do wyjaławiania również 40% H_2O_2 . Małe kawałki woszczyny umieszczano na szalkach i zale-

wano perhydrolem. Czas wyjaławiania trwał 2 godziny i połączony był z częstym skłócaniem zawartości szalki. Po trzykrotnym przemyciu wodą destylowaną jałową i kilkudniowym przetrzymaniu w termostacie w warunkach jałowych w celu odparowania nadmiaru wody, dokonywano posiewów kontrolnych, które wykazały znów całkowitą jej jałowość.

Wyjaławiając woszczynę wysoką temperaturą pod podwyższonym ciśnieniem i w parze wodnej, część substancji o charakterze lipidowym stopiła się i zakrzepła na dnie, część zaś pozostała w grubszych warstwach woszczyny. Przez zmianę struktury stała się ona bardziej sucha. Przy zastosowaniu 40% H_2O_2 , woszczyna ciemno brązowa stała się jasnożółta i krucha, ale nieco twardsza od woszczyny normalnej lub też wyjałowionej innym sposobem. Wynikałoby z tego, że zmiany zarówno fizyczne jak i chemiczne powstałe w woszczynie pod działaniem podwyższonej temperatury i ciśnienia oraz 40% H_2O_2 są różne. Przypuszczano, że bardziej dostępna jako pokarm dla larw mola będzie woszczyna wyjałowiona podwyższoną temperaturą w parze wodnej (autoklawowana).

W celu otrzymania jaj, wybierano z dzikich hodowli — które prowadzono w dość dużych rozmiarach — kilka zapłodnionych samic i umieszczano w czystym słoju pojemności około 1000 ml. Słój z wierzchu przykrywano szczelnie dwoma warstwami kalki kreślarskiej w ten sposób, że wewnętrzna jej warstwa posiadała szereg wyciętych drobnych otworów; druga zewnętrzna warstwa kalki szczelnie przykrywała pierwszą, a brzegi obydwóch warstw owiazywano sznurkiem dokoła brzegu słoja. Wykorzystując sposób składania jaj przez samice zmuszano je w ten sposób składać jaja tylko na gładkiej kalce. Przestrzenie wolne, powstałe pomiędzy dwoma warstwami kalki były jedynym miejscem, w którym mogły one złożyć swe jaja. Stosując ten sposób, można było — zależnie od potrzeb — otrzymać jaja pojedyncze, lub po kilkanaście i kilkadziesiąt w grupie.

Do wyjaławiania jaj zastosowano jako antyseptyk 1% wodę bromową. Kąpano jaja w tak stężonym roztworze przez 3 minuty, a następnie starannie kilkakrotnie wyplukano je w jałowej wodzie destylowanej. Posiewy kontrolne w ten sposób wyjaławianych jaj wykazały zupełny brak bakterii na zewnętrznej pokrywie chitynowej i na kalce kreślarskiej. Wyjaławiane jaja wraz z wyciętym kawałkiem kalki kreślarskiej umieszczano w jałowych szalkach w celu stwierdzenia, czy woda bromowa stosowana w tym stężeniu nie zabija zarodka.

W wyniku wielu prób stwierdzono, że najlepsze do wyjąławiania i gwarantujące wylęg larwy są jaja, których zarodek osiągnął taki rozwój, że widać go pod słabym powiększeniem mikroskopu przez przezroczystą skorupkę jaja. Jaja wyjąławiane w bardzo wczesnym stadium rozwoju zostają niekiedy całkowicie zabite.

Hodowlę larw w celach doświadczalnych prowadzono w erlenmeyerkach pojemności 300 ml, które zamykano tamponem z waty. W pierwszej części doświadczenia, wszystkie kultury — hodowle larw prowadzone były w temperaturze 25—27° i około 70—80% wilgotności. Hodowle jałowe larw prowadzono w erlenmeyerkach tej samej pojemności; wagowe oznaczone ilości woszczyzny trzykrotnie autoklawowano, następnie inkubowano przez kilka dni w termostacie w temperaturze 35° i sprawdzano na jałowość, pobierając za każdym razem sześć prób do posiewu z różnych miejsc woszczyzny. Po sprawdzeniu jałowości woszczyzny, umieszczano wewnątrz erlenmeyerki wraz z kalką kreślarską z określoną ilością jaj jałowych i prowadzono hodowlę w termostacie w temperaturze 35° i około 70—80% wilgotności.

Wodę, suchą substancję, frakcję lipidową i azot w woszczyźnie oznaczano w ten sposób, że określoną wagową ilość woszczyzny zawijano w sączek z bibuły i zawiązywano nitką uprzednio wysuszoną i zważoną wraz z sączkiem. Całość suszono w suszarce w temperaturze 105° przez 6 godzin. Różnicę ciężaru początkowego i końcowego uważano za ilość wyparowanej wody. Wysuszoną w ten sposób woszczyznę wraz z sączkiem poddawano ekstrakcji eterowej w aparacie Soxletta. W części rozpuszczalnej odparowywano eter a pozostałość i część nierozpuszczalną w eterze suszono w suszarce próżniowej w temp. 45° do stałej wagi. W suchej substancji oraz we frakcji lipidowej oznaczano azot metodą Kjeldahla.

Przy izolowaniu bakterii jelitowych obrano dwie drogi postępowania. W pierwszym wypadku larwę wagi od 100 do 200 mg, lekko narkotyzowano eterem lub benzyną i przypinano dwoma jałowymi szpilkami do jałowego podłoża korkowego w ten sposób, aby skurczoną po narkozie larwę rozciągnąć. Jałowymi nożyczkami rozcinano jamę ciała od strony brzusznej rozsuwając na boki i przypinając natychmiast do podłoża powłokę chitynową. Wyjąłowioną pensetą chwytano odsłonięty przewód pokarmowy możliwie najbliżej jamy gębowej i przecinając podtrzymujące mięśnie i gęsto oplatające przewody trachealne wyjmowano go i układano na jałowym szkiełku przedmiotowym. Ostrymi nożyczkami rozcinano wzdłuż cały przewód odkładając

na boki ścianę jelita. Z rozciętego jelita pobierano platynową eżą zawartość jelita i dokonywano posiewów.

Drugi sposób podobny był do pierwszego z tą różnicą jednak, że wyizolowany przewód pokarmowy w sposób wyżej podany, cięto nożyczkami na drobne kawałki i zalewano pożywką lub też rozcierano go w jałowym moździerzu, dolewano do utworzonej miazgi 5 ml. destylowanej jałowej wody i z zawiesiny dokonywano posiewów.

Zastosowano dwie pożywki:

pożywka Nr 1	K_2HPO_4	— 0,05 g
	KH_2PO_4	— 0,05 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,05 g
	NaCl	— 0,05 g
	$CaCO_3$	— 0,01 g
	pepton	— 1,5 g
	glukoza	— 1,0 g
		na 100 ml wody destylowanej.

Ponieważ wzrost bakterii jelitowych na pożywce Nr 1 był bardzo słaby, postanowiono więc użyć jako pożywki wyciągu z larw mola. W tym celu określoną wagową ilość żywych larw miażdżono w moździerzu porcelanowym i zalewano trzykrotną objętością wody wodociągowej, dokładnie wymieszano, zlewano do kolby i ogrzewano w 100° w aparacie Kocha przez 30 minut. Sączono następnie na gorąco przez sączek z bibuły. Otrzymano stężony wyciąg koloru ciemno brązowego. Wyciąg z larw przechowywano jałowo używając go jako pożywki Nr 2 zarówno do podłoża stałego jak i płynnego w stężeniu 30%-wym.

Część doświadczalna

I. Przebieg rozwoju larw odżywianych różnym pokarmem

Celem tej części pracy było oznaczenie ilościowe niektórych składników chemicznych różnej woszczyzny pszczelej, zbadanie rozwoju larw na różnej woszczyźnie o składzie normalnym oraz o składzie zmienionym zarówno pod względem fizycznym jak i chemicznym.

Do analizy użyto jednego plastra woszczyzny pszczelej starej, w której były komórki robotnic, trutniów i królowej oraz kilka kawałków woszczyzny świeżej, sporządzonej przez pszczoły poza ramkami ¹⁾.

¹⁾ Świeżo sporządzona woszczyzna była koloru białego, nie było w niej złożonych jaj ani miodu.

W tych czterech gatunkach woszczyzny²⁾ określano wodę, frakcję lipidową (eterową) oraz substancję suchą i azot. Rezultaty analiz zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. — Table 1.

Średnia zawartość procentowa wody, frakcji lipidowej (eterowej), suchej substancji i azotu w woszczyźnie pszczelej średnia 4—6 analiz
The mean percent content of water, lipid fraction (ether), dry substance, nitrogen in bees-wax. Average 4—6 analyses.

Gatunek badanej woszczyzny The kind of the examined wax	Woda Water.	Frakcja lipidowa Lipid fraction.	Sucha substancja Dry substance	Azot Nitrogen
	%	%	%	%
Stara — komórki robotnic Old-cells of workers	6.69	37.90	55.40	3.17
Stara — komórki trutniów Old-cells of drones	4.15	39.28	56.56	1.73
Stara — komórki królowej Old-cells of the queen	4.00	39.32	56.66	0.75
Świeżo sporządzona (komórki robotnic) Freshly prepared (cells of workers)	0.12	99.64	0.23	0.09

Z zestawienia dokonanego w tabeli I wynika, że w obrębie jednego plastra, zależnie od tego jakie komórki zawierała ta część plastra, występują znaczne różnice w składzie chemicznym. Wyniki sześciu oznaczeń azotu w woszczyźnie świeżo sporządzonej wahały się w granicach od 0,07—0,10‰; przypuszczać należy, że źródłem tego składnika w tej woszczyźnie jest prawdopodobnie pyłek roślin, który spada z odnóży pszczół. Analiza woszczyzny pszczelej świeżo sporządzonej wskazuje, że jest ona zbudowana prawie wyłącznie z substancji o charakterze lipidowym.

Znaczne różnice w procentowej zawartości poszczególnych składników jakie zostały oznaczone w komórkach robotnic, trutniów i królowej nasuwają przypuszczenie, że wyzyskanie pokarmu jakim są karmione czerwie pszczół — jest bardzo różne. Przypuszczenie to nabiera większego prawdopodobieństwa jeśli weźmiemy pod uwagę różnice wielkości imago: robotnic, trutniów i królowej.

²⁾ Określenie „gatunek woszczyzny“ użyte zostało w celu podkreślenia różnicy składu chemicznego między woszczyzną świeżo sporządzoną, a woszczyzną starą w której przeszedł swój rozwój czerwie robotnic, trutniów czy też królowej.

pochewki z przędzy, żerują u podstawy komórek woszczyzny i wygryzają głębokie korytarze.

Hodowla larw odżywianych woszczyną starą trwała od 45 do 50 dni, średnio 48 dni. W czterech równoległych kulturach (1, 2, 3, 4) woszczyna była całkowicie zjedzona a ilość znalezionych motyli i poczwerek z 30 włożonych jaj wynosiła: pierwsza — 25, druga — 24, trzecia — 26 i czwarta — 20. W dwóch kulturach pozostało jeszcze trochę pokarmu, ciężar jego w 5 kulturze wynosił 0,8 g, zaś w 6 kulturze 0,5 g, a ilość znalezionych poczwerek i motyli wynosiła: w piątej — 29, a w szóstej kulturze — 28. Wynikałoby z tego, że larwy w pierwszych czterech kulturach część swego zapotrzebowania na azot pokryły przez spożycie pewnej ilości larw znajdujących się razem z nimi w kulturze. Zatem brak dostatecznej ilości w pokarmie składników przypuszczalnie o charakterze azotowym, powoduje, że zapotrzebowanie na ten składnik, pokrywają one przez pożeranie innych larw, mimo, że mają jeszcze do spożycia pewną ilość pokarmu zawierającego ten składnik.

Hodowle B, na woszczynie starej uważano za hodowle kontrolne.

H o d o w l e C.

Hodowlę larw na woszczynie starej — komórki trutniów prowadzono w tej samej liczbie, w tych samych warunkach co i poprzednie oraz z tą samą ilością jaj. Sposób żerowania larw w tej hodowli niczym nie różnił się od sposobu żerowania larw karmionych woszczyną starą — komórki robotnic. Jedynie czas rozwoju był w tych hodowlach o kilka dni dłuższy: pierwsza — 53, druga — 53, trzecia — 55, czwarta — 50, piąta — 56 i szósta — 57 dni, średnio 54 dni. We wszystkich kulturach woszczyna była całkowicie zjedzona, a ilość znalezionych poczwerek i motyli była następująca: pierwsza — 20, druga — 18, trzecia — 22, czwarta — 19, piąta — 15 i szósta — 18. Z powyższych danych wynika że w kulturach, w których larwy karmione były woszczyną starą — komórki trutniów, znacznie większa ilość larw została zjedzona przez pozostałe przy życiu larwy. Dane te potwierdzałyby jeszcze raz, że wzajemne pożeranie się larw jest uwarunkowane zapotrzebowaniem na azot, a większa ich ilość zjedzona przez larwy pozostałe jest wynikiem znacznie mniejszej zawartości azotu w podanej woszczynie (1,73%). Tym również należałoby tłumaczyć znacznie przedłużony czas rozwoju.

Hodowle D.

Jako pokarm dla larw w tej serii doświadczeń użyto ich wydaliny w ilości 7 g. Hodowlę prowadzono w tych samych warunkach co hodowlę A, B i C. Analiza wydaliny podanych larwom jako pożywienia wykazała następujące średnie z sześciu oznaczeń:

wody	— 7,87%
suchej substancji	— 72,80%
frakcji lipidowej	— 18,83%
azotu	— 3,63%

Rozwój larw mola odżywianych wydaliniami trwał od 330 do 338 dni, średnio 335 dni. Sposób żerowania larw był w tym wypadku nieco odmienny. Po trzydniowym bezustannym chodzeniu po ścianach erlenmeyerki larwy ukryły się pod warstwą wydaliny. Procesy rozwojowe były bardzo powolne, wzrost bardzo ograniczony, a po miesiącu widać było na dnie erlenmeyerki pochwęki z przędzy, w których znajdowały się ukryte larwy. W miarę postępującego rozwoju ilość ich zmniejszała się. W końcowym efekcie przeprowadzonej w ten sposób hodowli otrzymano następującą ilość poczwerek i motyli w poszczególnych kulturach: pierwsza — 6, druga — 5, trzecia — 2, czwarta — 3, piąta — 4 i szósta — 5. Oprzędy, w których znajdowały się poczwarki oraz te, z których wyszły już motyle były bardzo cienkie. Mała ilość pozostałych larw, które zdołały się utrzymać przy życiu i osiągnąć swój pełny rozwój, drobne bardzo motyle i poczwarki oraz cienkie oprzędy i długotrwały rozwój larw karmionych wydaliniami, wskazywałyby, że przyczyną tego jest być może zbyt mała ilość w wydalinach przyswajalnych związków azotowych. Z doświadczeń przeprowadzonych nad rozwojem larw mola odżywianych wydaliniami wynika, że chociaż wartość procentowa azotu zawartego w podanym pożywieniu jest prawie taka sama jak w woszczynie starej — komórkach robotnic, to widocznie azot w wydalinach występuje w związkach bardzo mało, albo wcale nieprzyswajalnych przez larwy. Rozwój larw odżywianych wydaliniami trwał około 7 razy dłużej niż na woszczynie starej (średnio 335 dni). Decydującym zdaje się czynnikiem w rozwoju larw jest nie tylko jak uważano dotychczas obecność w diecie dostatecznej ilości przyswajalnych związków azotowych. Trudno przypuścić, aby siedmiokrotnie dłuższy czas rozwoju larw odżywianych wydaliniami był zależny od tych podstawowych składników pokarmu, które zostały

oznaczone w wydalinach. Wydaje się, że w wydalinach brak było również dostatecznej ilości jakichś nieznanych dotychczas składników, które prawdopodobnie regulują procesy metamorfozy. Przyjęcie to nabiera większego prawdopodobieństwa na podstawie wyników doświadczeń otrzymanych w dalszej części tej pracy.

Hodowle E.

Do doświadczeń wybrano plaster woszczyny starej — komórki robotnic, z którego próbki pobrane do analizy, wykazały zawartość procentową oznaczonych składników zbliżoną do zawartości tych składników w woszczynie podanej larwom w hodowlach B. 100 g tej woszczyny pociętej na nieduże kawałki umieszczano w kolbie, zalewano 1000 ml wody destylowanej i autoklawowano przez półtorej godziny pod ciśnieniem 2,5 atm. Po autoklawowaniu sączono przez bibułę na gorąco, a pozostałość na sączku suszono na powietrzu. Otrzymany przesącz był koloru ciemno brązowego, a jego pH wynosiło 1.8. Woszczyna otrzymana w ten sposób uległa znacznym zmianom. Przede wszystkim stała się ona krucha i rozpadła się na pojedyncze komórki. W wielu wypadkach, wytopiony воск leżał w oddzielnych grudkach.

W ten sposób przygotowaną woszczynę, umieszczano w ilości 7 g w sześciu erlenmeyerkach pojemności 300 ml z taką samą ilością jaj złożonych na kalce kreślarskiej jaką dawano w poprzednich hodowlach, oraz w tych samych warunkach doświadczenia co i poprzednie hodowle. Celem tej hodowli było stwierdzenie, do jakiego stopnia woszczyna pszczela zmieniona przez ekstrakcję wodną w autoklawie wpływa na rozwój larw mola?

W tym wypadku żerowanie larw cechowała nieprawidłowość i larwy rozpoczynały żerowanie najczęściej w ściankach woszczyny. Hodowla od chwili wylęgu z jaj aż do otrzymania pierwszego motyla trwała od 68 do 72 dni, średnio 70 dni. Pokarm we wszystkich erlenmeyerkach został całkowicie spożyty, a ilość znalezionych w poszczególnych erlenmeyerkach poczwerek i motyli była następująca: pierwsza — 28, druga — 29, trzecia — 27, czwarta — 30, piąta — 29, szósta — 28. Wylęgte motyle i znalezione poczwarki były trochę mniejsze niż poczwarki i motyle otrzymane w hodowli B. Oprządy larw były normalne. Mała ilość zjedzonych larw w tych kulturach wskazywałaby, że zawartość związków azotowych koniecznych larwom była dla nich

wystarczająca. Wynika z tego, że związki azotowe zawarte w starej woszczynie nie przechodzą do roztworu wodnego. Ciekawy jest jednak fakt, że czas rozwoju larw karmionych woszczyną po ekstrakcji wodnej jest o 20 dni dłuższy w porównaniu z czasem rozwoju larw w hodowli B. Jak należy przypuszczać — przyczyną tego może być:

- 1) brak w pokarmie kwasów tłuszczowych, które przeszły do przesączu, a więc brak składnika lub też składników frakcji lipidowej, który powoduje po prostu częściowy głód rozwijających się larw,
- 2) częściowy brak w pokarmie po ekstrakcji wodnej ewentualnego składnika, który prawdopodobnie reguluje procesy metamorfozy, i
- 3) zmiana struktury woszczyny wywołana wysoką temperaturą.

Trudno jest w tej chwili ustalić właściwe źródło przyczyn przedłużenia czasu rozwoju, wydaje się jednak, że główną tego przyczyną jest brak w ekstrahowanej woszczynie dostatecznej ilości domniemanego czynnika, który reguluje procesy metamorfozy.

Hodowle F.

W poszukiwaniu granicy, do jakiej woszczyna zmieniona może być spożywana przez larwy, przeprowadzono następujące hodowle.

Jako pokarm dla larw użyto woszczyny starej — komórki robotnic z tego samego plastra co i w hodowli E. 100 g tej woszczyny ekstrahowano w autoklawie przez półtorej godziny pod ciśnieniem 2,5 atm. wraz z 1000 ml wody destylowanej. Po przesączeniu i częściowym przesuszeniu reszty woszczyny nierozpuszczalnej w wodzie, całość zebrano do kolby i zalano podwójną objętością 10% roztworu NaOH i pozostawiono w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godzin wstrząsając często zawartość kolby. Po upływie tego czasu, roztwór sączono przez bibułę, a pozostałość na sączku przemywano wodą destylowaną aż do zaniku reakcji alkalicznej.

Zebraną pozostałość z sączka zalewano podwójną objętością — 10% roztworu HCl i wstrząsając często zawartość kolby ekstrahowano woszczynę w ciągu 24 godz. w temperaturze pokojowej. Sączono przez bibułę, a pozostałość na sączku znów przemywano wodą destylowaną aż do zaniku reakcji kwaśnej.

Pozostałość na sączku po ekstrakcji kwasem, zebrano ponownie do kolby; zalewano podwójną objętością 96% alkoholu etylowego i ekstrahowano w ciągu 24 godzin w temperaturze pokojowej często

wstrząsając. Po odsączeniu alkoholu i dokładnym przemyciu wodą destylowaną, pozostałość otrzymaną w ten sposób suszono na powietrzu.

Woszczyna po tych zabiegach rozpadła się na poszczególne komórki oraz zawierała dużo drobnych części komórek, była sucha, krucha i rozsypywała się za dotknięciem.

Hodowle w sześciu erlenmeyerkach prowadzono w tych samych warunkach co i poprzednio.

Czas trwania rozwoju larw był ten sam co i w hodowli E, tzn. średnio 70 dni. We wszystkich sześciu równoległych kulturach woszczyna całkowicie była zjedzona. Ilość znalezionych poczwerek i motyli w poszczególnych kulturach przedstawiała się następująco: pierwsza — 27, druga — 28, trzecia — 28, czwarta — 29, piąta — 27, szósta — 27. Oprzędy larw były normalne, a znalezione poczwarki i motyle były tej samej wielkości co i w hodowli E.

Porównując wyniki hodowli larw w hodowli E z wynikami otrzymanymi w hodowli F, stwierdzamy, że zarówno czas rozwoju, jakość kokonów sporządzonych przez larwy, ilość wyhodowanych poczwerek i motyli jest prawie taka sama. Wynikałoby z tego, że zarówno ekstrakcja wodna woszczyny — dokonana na gorąco — jak i ekstrakcja na zimno 10% NaOH, 10% HCl oraz alkoholem nie pozbawia woszczyny tych składników, które są niezbędne dla rozwoju larw.

We wszystkich dotychczas przeprowadzonych hodowlach (hodowle A—F) stwierdzono, zależnie od jakości podanego larwom pokarmu, większy lub mniejszy ubytek larw w poszczególnych kulturach. We wszystkich stwierdzonych wypadkach ubytek ten jest wynikiem wzajemnego pożerania się larw. Ponieważ hodowle prowadzone były od ściśle określonych ilości jaj, przeto może się nasunąć podejrzenie, że straty wynikłe w hodowli przypisywane wzajemnemu pożeraniu się larw, mogą również powstać wskutek tego, że nie wszystkie larwy mogły się z jaj wylęgać.

Przeprowadzona hodowla kontrolna (6 kultur) z dokładnie odliczoną ilością jaj z podaniem znaczniejszych ilości pokarmu (30 g), wykazała, że w stosowanych warunkach doświadczenia używane jaja były zapłodnione i nieuszkodzone co gwarantowało ich wylęg. Zatem mniejsza ilość znalezionych w poszczególnych kulturach poczwerek i motyli — w hodowlach od A do F — może być tłumaczona tylko wzajemnym pożeraniem się larw w czasie ich rozwoju.

II. Hodowla larw w warunkach jałowych.

W celu zorientowania się o liczebności flory bakteryjnej występującej na woszczynie pszczelej, dokonano posiewów małych skrawków krawędzi komórek pszczelich. Jako podłoża stałego użyto 1,5% agaru na 100 ml pożywki Nr 1. Posiewów dokonywano w ten sposób, że wyjałowioną w ogniu pensetą pobierano z krawędzi próbkę woszczyny umieszczano na szalce i zalewano pożywką. Inkubowano w termostacie w temp. 25°. Po upływie doby na wszystkich szalkach miał miejsce bardzo obfity wzrost licznych kolonii bakteryjnych. Posiewów dokonywano po 15 z każdego gatunku woszczyny. Największa ilość kolonii bakteryjnych wyrastała przy posiewach woszczyny starej — komórki robotnic i trutniów. Trudno jest w tym wypadku podać dokładniej ilość wyrosniętych kolonii bakteryjnych, bowiem już po 24 godzinach wiele kolonii zlewało się razem w jedną dużą, lub też wyrastały wachlarzowo z kawalczka woszczyny.

Sposób żerowania larw na woszczynie starej — komórki robotnic nasuwa podejrzenie związania go z obecnością znajdujących się tam bakterii. Jaki przebieg będzie miał rozwój larw na woszczynie jałowej, jest przedmiotem następnej serii doświadczeń.

Wyniki hodowli E i F zdecydowały, że jako środka wyjaławiania użyto podwyższonej temperatury z parą wodną pod ciśnieniem (autoklaw). Sposób wyjaławiania woszczyny opisano w części metodycznej.

Do hodowli jałowej użyto plastra woszczyny starej — komórki robotnic. Pokrajaną na drobne kawałki woszczynę dokładnie zmieszano i umieszczano w erlenmeyerkach pojemności 300 ml po 9 g w każdej. Z każdej erlenmeyerki pobierano próbki woszczyny w ilości 2 g i w tej ilości oznaczano w trzech równoległych próbach woszczyny z każdej erlenmeyerki: wodę, frakcję lipidową (eterową), suchą substancję i azot. Wyniki analiz tej woszczyny były następujące: wody — 6,5%, frakcja lipidowa — 37,5%, substancja sucha — 56%, azotu — 3,19%. Po oznaczeniu w woszczynie wyżej wymienionych składników, wybrano do doświadczeń tylko te erlenmeyerki, w których analiza zawartej w nich woszczyny wykazała identyczny skład chemiczny. Erlenmeyerki z woszczyną o identycznym składzie chemicznym w ilości 8 sztuk podzielono na dwie serie. Z tych jedną serię poddano wyjaławianiu w autoklawie (hodowle jałowe A), pozostałe zaś 4 pozostawiono jako kontrolne (hodowle nie jałowe kontrolne A₁). Po wyjałowieniu, erlenmeyerki zamknięto korkami z waty, wstawiono do termostatu na dwa dni w temp.

35° w celu doprowadzenia do rozwoju tych form, które ewentualnie mogłyby przetrwać jako spory. Po dwudniowej inkubacji, ponownie poddawano wyjaławianiu w autoklawie i znów inkubowano w temp. 35°. Po trzykrotnym wyjałowieniu dokonywano kontrolnych posiewów małych kawaleczków woszczyny. Jako podłoża agarowego użyto pożywki Nr 1 z dod. agaru. Z każdej erlenmeyerki pobierano po trzy próbki do posiewów i inkubowano przez pięć dni w temp. 35°. Po upływie tego czasu nie stwierdzono żadnego rozwoju mikroorganizmów.

Hodowle jałowe A.

W erlenmeyerkach z woszczyną wyjałowioną i niewyjałowioną umieszczano po 30 jaj złożonych na kalce kreślarskiej uprzednio wyjałowionych. (Sposób wyjaławiania jaj podano w części metodycznej). Hodowlę prowadzono w termostacie w temperaturze 35° i wilgotności 70—80%. Czas rozwoju liczony był tak samo jak w kulturach poprzednich.

Sposób żerowania larw, karmionych woszczyną wyjałowioną charakteryzuje się tym, że pierwsze korytarze drążą one w zakrzepłej na dnie erlenmeyerki warstwie lipidowej (fot. Nr 1 i Nr 2). W miarę postępującego rozwoju, larwy spożywają dalsze partie woszczyny, co ma miejsce dopiero wówczas, kiedy niemal cała warstwa lipidowa znajdująca się na dnie erlenmeyerki jest spożyta. Spostrzeżenia te pozwalają przypuszczać, że w pierwszych okresach rozwoju — w warunkach jałowych — podstawowym pożywieniem larw są lipidy. Larwy mola hodowane w warunkach jałowych żerowały pojedynczo, nie tworzyły zbitych gromad jak to ma miejsce w warunkach gdy są karmione woszczyną niejaloową. Jak już wspomniano, w miarę postępującego rozwoju larwy spożywają inne części woszczyny, drążąc w nich korytarze. Z tą chwilą daje się zauważyć zmniejszenie ich ilości w poszczególnych kulturach. Zmniejszenie się ilości larw w poszczególnych kulturach jest początkowo nieznaczne i niezbyt uchwytne ze względu na ich ukryty tryb życia. Ostateczny wynik hodowli trzydziestu larw w warunkach jałowych był następujący: kultura I — 1 motyl, kultura II — 2 poczwarki w bardzo cienkich oprzędach, z których nie wylęgały się motyle, kultura III i IV — po jednej poczwarcie w bardzo cienkich oprzędach, z których również nie wylęgały się motyle (fot. Nr 3 i Nr 4). Posiewy kontrolne woszczyny i wydaliny larw mola hodowanych w warunkach jałowych, wykazały całkowitą jałowość zarówno woszczyny jak i wydaliny. Czas rozwoju jałowych larw mola odżywianych jałową

woszczyną był w poszczególnych kulturach następujący: I — 96 dni, II — 98 dni, III — 97 dni i IV — 96 dni, średnio 97 dni. We wszystkich kulturach woszczyna została spożyta w bardzo małych ilościach. Zebrane ilości nie zjedzonej woszczyny w poszczególnych kulturach były następujące: I — 5,82 g, II — 5,96 g, III — 6,25 g i IV — 5,97 g, a więc larwy spożyły: w I — 1,18 g, II — 1,04 g, III — 0,75 g, IV — 1,03 g. Wprawdzie liczby wskazujące ilość spożytej woszczyny nie są dokładne bowiem bardzo trudno jest oddzielić pozostałą woszczynę od przędzy i drobnych wydaliny, oraz w czasie oddzielania woszczyny od wydaliny i przędzy wyparowuje woda, to jednak mimo tych nieuniknionych błędów oznaczone wagowe ilości nie zjedzonej przez larwy woszczyny pozwalają na wyciągnięcie pewnych wniosków.

W kulturach jałowych uderzająca jest przede wszystkim wyjątkowo mała ilość otrzymanych poczwerek, a w jednym tylko wypadku motyla. Zarówno poczwarki jak i wylęgły motyl były egzemplarzami bardzo drobnymi (wymiary otrzymanego w hodowli jałowej motyla były następujące: długość ciała — 7 mm, szerokość wraz z rozpiętymi skrzydłami — 20 mm, podczas gdy wymiary motyli których nie odczuwały braku pokarmu wyhodowanych w warunkach nie jałowych wynoszą: długość ciała 22 mm, szerokość zaś wraz z rozpiętymi skrzydłami — 35 mm). Poczwarki, jak już wspomniano, znajdowały się w bardzo cienkich oprzędach. Wskazywałoby to, że larwy hodowane w warunkach jałowych posiadały niedostatek potrzebnych do rozwoju związków azotowych. Łączyć to należałoby z małą ilością spożytego pokarmu, któremu towarzyszy kompletne pożarcie innych larw. Ponieważ jednak podany pokarm był pokarmem na którym najlepiej rozwijały się larwy w warunkach nie jałowych, przeto nasuwa się przypuszczenie, że mikroflora jelitowa pełni jakąś inną jeszcze funkcję w procesach rozwojowych larwy, związaną prawdopodobnie z przyswajaniem przez nią związków azotowych zawartych w pokarmie. Wskazuje na to mała ilość spożytej woszczyny.

Różnice rozwojowe wystąpią wyraźniej przy porównaniu wyników hodowli otrzymanych w warunkach jałowych (hodowle jałowe A) z wynikami kontrolnymi (hodowle nie jałowe A₁). Przebieg rozwoju larw karmionych woszczyną nie jałową był w tych warunkach doświadczenia stosunkowo krótki i przedstawiał się w poszczególnych kulturach następująco: kultura I — 39 dni, II — 38 dni, III — 24 dni i IV — 29 dni.

We wszystkich kulturach woszczyna była całkowicie zjedzona. Ilość zaś znalezionych larw i poczwerek w poszczególnych kulturach na 30 włożonych jaj była następująca: I — 24 larwy, II — 16 larw i 2 poczwarki, III — 18 larw i 2 poczwarki, IV — 26 larw. Hodowla kontrolna (A_1) trwała tylko do momentu zjedzenia przez larwy wszystkiej woszczyny; znając bowiem ich zdolność wzajemnego pożerania z braku pokarmu (patrz wyniki hodowli nie jałowych A, nie jałowych B kultury: 1, 2, 3, 4, hodowle nie jałowe C kultury: 1, 2, 3, 4, 5, 6, w części „Przebieg rozwoju larw odżywianych różnym pokarmem“) musiano przerwać hodowlę, wskutek tego czas rozwoju larw w hodowli kontrolnej A_1 liczony od wylęgu z jaj aż do wylęgu motyla powinien być nieco dłuższy. Tylko bowiem w tym wypadku mógłby on być porównywalny z czasem rozwoju larw hodowanych w warunkach jałowych.

Porównując wyniki hodowli larw odżywianych woszczyną jałową i nie jałową, stwierdzić należy w pierwszym rzędzie minimalne spóźnienie przez larwy pokarmu jałowego. Przyczyną zdaje się najważniejszą dla której larwy hodowane w warunkach jałowych spożyły tak małą ilość woszczyny może być — brak mikroflory jelitowej. Należałoby zatem obecność flory jelitowej u larw mola wiązać z możliwością trawienia i asymilowania podanego pokarmu, przy czym istnieją, jak należy przypuszczać dwie drogi do wytłumaczenia tego zjawiska.

1. Ponieważ posiewy woszczyny pszczelej wykazały obecność dużej ilości bakterii nasuwa się przypuszczenie, że źródłem azotu rozwijających się larw jest być może białko mikroflory woszczyny. Gdyby rzeczywiście źródłem azotu rozwijających się larw mola było białko mikroflory woszczyny, to sądzić należy, że zmiany zarówno fizyczne i chemiczne jakim uległa woszczyna w kulturach E i F dotyczą również i zmian jej mikroflory. Wprawdzie woszczyna suszona po ekstrakcji wodnej w autoklawie podlegała infekcji, ale zmiany jakim ona uległa niewątpliwie musiały się również głęboko odbić na składzie mikroflory, którą spontanicznie została zakażona. Wprawdzie czasu rozwoju larw w kulturach nie jałowych E i F oraz w kulturach nie jałowych B nie można również porównywać bez pewnych zastrzeżeń, bowiem hodowle nie jałowe E i F oraz B (kontrolne) prowadzone były w temp. 25° , a hodowle jałowe w temp. 35° , to jednak znając właściwość larw mola woskowego, dzięki której mogą one produkować znaczne ilości ciepła przypuszczać należy, że czynnik temperatury (w granicach 10°C) w hodowlach nie jałowych nie odgrywał tu decydującej roli.

2. Minimalną ilość spożytej woszczyzny w kulturach jałowych połączoną jednocześnie z kompletnym pożarciem prawie wszystkich rozwijających się tam larw, należy raczej łączyć z nieprzyswajaniem związków azotowych zawartych w woszczyźnie przez larwy pozbawione flory jelitowej. Jeżeli przypuszczenie to jest słuszne, to w takim razie flora jelitowa larw mola pełniłaby jakąś pośrednią funkcję w trawieniu związków azotowych, które w braku mikroflory nie mogą być przez larwę asymilowane. W dalszym ciągu tej pracy będą dostarczone częściowo pośrednie dowody słuszności interpretacji tego zjawiska.

W świetle wyników otrzymanych z hodowli w warunkach jałowych, przedłużony czas rozwoju larw w hodowlach E i F nie może być tłumaczony tylko zmianom jakim uległ podanym w tych hodowlach larwom pokarm. Raczej należałoby przypuszczać, że przyczyną są zaburzenia w mikroflorze jelitowej wywołane zmianą podanego pokarmu. Podobne zresztą zjawisko widzimy i w hodowlach D, w których jako pokarm podano larwom ich własne wydaliny. Małe egzemplarze motyli otrzymane w tych hodowlach oraz znaczna ilość pożartych larw — mimo znacznej zawartości azotu (3,63%) — nie może być przypisywana — tak jak początkowo sądzono — obecności w tym pokarmie związków nieprzyswajalnych przez larwy. Należałoby raczej przypuszczać, że flora jelitowa larw mola prócz funkcji pośredniej udostępnienia larwom związków azotowych zawartych w woszczyźnie, pełni jeszcze jakąś dodatkową funkcję, która ma wpływ na czas przebiegu procesów metamorfozy.

Interpretacja tego zjawiska szerzej będzie omówiona w dyskusji wyników.

Hodowle jałowe B.

Czas i sposób wyjaławiania woszczyzny 40% H_2O_2 podano w części metodycznej. Do tych doświadczeń użyto tej samej woszczyzny, którą podano larwom w hodowlach jałowych A, zawierała ona ten sam procent oznaczonych składników co i kultury poprzednio wymienione. Hodowlę prowadzono w probówkach uprzednio wyjaławianych, w nich umieszczano woszczyznę wyjałowioną 40% H_2O_2 i wyplukaną w wodzie destylowanej jałowej. Do każdej próbówki z kawałkiem wyjałowionej w ten sposób woszczyzny wkładano po jednym jaju złożonym na kalce kreślarskiej. Hodowlę prowadzono w termostacie w temp. 35°C i wilgotności 70—80%.

Hodowla larw mola karmionych woszczyną wyjałowioną 40% H_2O_2 była niezmiernie interesująca. Wylęgle z jaj larwy po dwudniowym szybkim łażeniu po ściankach probówki przystąpiły do żerowania. Dowodem tego były jasne i bardzo drobne wydaliny znajdujące się na dnie probówki. We wszystkich jednak kulturach — których równolegle prowadzono cztery — larwy po pięciu, sześciu dniach zginęły.

W celu wyjaśnienia, czy flora bakteryjna pełni aż tak doniosłą rolę, że staje się decydującym czynnikiem w rozwoju larwy, czy też zmiany jakim uległa woszczyna podczas wyjaławiania 40% H_2O_2 są przyczyną braku rozwoju larw i ich śmiertelności, podjęto następujące doświadczenie.

Do wszystkich czterech probówek, w których znajdowały się kawałki wyjałowionej 40% H_2O_2 woszczyny, włożono do każdej z nich po jednej larwie mola pobranej z hodowli niejalowej, o ciężarze 15—20 mg. Hodowano je w tych samych warunkach doświadczenia co i poprzednie. Sposób żerowania larw nie jałowych karmionych woszczyną wyjałowioną 40% H_2O_2 był zupełnie normalny. Larwy przystąpiły natychmiast do żerowania, a po czternastu dniach spożyły one we wszystkich kulturach woszczynę, a ciężar ich ciała w poszczególnych kulturach był następujący: I — 48 mg, II — 52 mg, III — 40 mg, IV — 50 mg.

Jak wynika z ostatnio przeprowadzonego doświadczenia larwy nie jałowe odżywianie woszczyną wyjałowioną 40% H_2O_2 chętnie spożywają ten pokarm i przybierają na wadze, co wskazuje, że zmiany zarówno chemiczne jak i fizyczne powstałe w woszczynie przez działanie 40% H_2O_2 nie są przyczyną śmiertelności larw jałowych. Pozostaje zatem przyjąć drugą możliwość, że larwy mola pozbawione flory jelitowej nie są w stanie rozkładać tych składników pokarmowych zawartych w woszczynie, które są jej niezbędne do rozwoju. Zatem proces rozwoju larw byłby całkowicie zależny od flory bakteryjnej jelita, która pełniłaby jakąś pośrednią funkcję w trawieniu składników występujących w pokarmie, w formie nieprzyswajalnej przez larwy i zamianie tych składników na formę przyswajalną przez larwy.

Na podstawie porównania wyników hodowli otrzymanych w kulturach jałowych A i B możnaby przypuszczać, że larwy w kulturach A mogły przejść swój rozwój tylko dzięki temu, że swoje zapotrzebowanie na azot mogły pokryć kosztem pożarcia innych larw. Wzajemne pożeranie się larw występuje prawdopodobnie w pierwszych dniach rozwoju

larwalnego. Trudno uchwytne jest ono w pierwszych trzech tygodniach rozwoju ze względu na ukryty tryb życia larw i mniejsze prawdopodobnie zapotrzebowanie na azot w tym okresie a łatwiejsze do uchwycenia w późniejszych okresach rozwoju, który połączony jest ze zwiększonym zapotrzebowaniem na azot w związku z przędzeniem. Przypuszczenie to potwierdza końcowy wynik hodowli larw w warunkach jałowych (hodowle jałowe A) i minimalna ilość spożytego w tych warunkach pokarmu jałowego. W ostatecznym wyniku przeprowadzonych rozważań nad hodowlą larw w warunkach jałowych możnaby zdaje się wysnuć wniosek, że larwy mola woskowego pozbawione flory jelitowej nie przyswajają pokarmu podanego w woszczynie, co potwierdza minimalna ilość spożytego pokarmu; flora jelitowa pełni prawdopodobnie jakąś pośrednią funkcję w trawieniu składników zawartych w woszczynie, zamieniając je na składniki przyswajalne przez larwę. W konsekwencji wynika z tego drugi wniosek, że prawdopodobnie rozwój larw całkowicie zależy od flory bakteryjnej i jest to czynnik decydujący. W następnym etapie podjętych prac dokonano prób zbadania flory bakteryjnej larw mola.

III. Flora bakteryjna larw mola

Ponieważ posiewy woszczyny pszczelej wykazały obfitą florę bakteryjną, to w pierwszych poszukiwaniach flory bakteryjnej u larw mola starano się zbadać obecność mikroflory w treści jelita larw. Do tego celu wybierano zwykle larwy starsze, wyrosnięte, wagi od 150 do 200 mg. Sposób operowania larwy w celu dokonania posiewów treści jelita został podany w części metodycznej.

Posiewów dokonywano na podłoże agarowe, w skład którego wchodziła pożywka Nr 1 o pH 7,0. Hodowlę prowadzono w temp. 35°. Po rozcięciu jelita, wyjałowionym oczkiem platynowym pobierano próbki z jelita i dokonywano posiewów. Dokonując posiewów treści jelita larwy liczone się z tym, że znaczna ilość bakterii znajdująca się w podanym pokarmie powinna znaleźć się również i w przewodzie pokarmowym. Wyniki posiewów, których dokonano piętnaście wykazały znaczne jej ubóstwo. Na poszczególnych szalkach wyrosły po dwie, trzy kolonie, mimo, że czas inkubacji trwał do 20 dni.

Przyczyn małej ilości wyrosniętych na szalkach kolonii bakteryjnych upatrywano w pierwszym rzędzie w niewłaściwym składzie dobranej pożywki, ponieważ bakterie larw mola występujące wewnątrz jelita są organizmami, jak należy przewidywać, wyspecjalizowanymi i mogą posiadać określone wymagania w zakresie składników pokarmowych, przeto zastosowano do następnych posiewów pożywkę Nr II (ekstrakt z larw) której sposób przygotowania i użycia został podany w części metodycznej.

Następnych posiewów dokonywano nie z treści jelita a ze skrawków jelita. Wypreparowane z jamy ciała jelito cięto na drobne kawałki wprost na szalki Petriego i zalewano pożywką Nr II używając jako podłoża agaru. Inkubowano w termostacie w temperaturze 35°. Po 24-godzinnej inkubacji otrzymywano na niektórych szalkach bardzo obfity wzrost kolonii bakteryjnych. Nie rzadko trafiały się szalki, w których po 24 godzinach powierzchnia podłoża całkowicie pokryta była koloniami bakteryjnymi, utrudniając w ten sposób przeszczepienie czystych kultur.

Z posiewów w ten sposób dokonanych wyodrębniono 12 szczepów bakteryjnych, o nieznanym własnościach fizjologicznych.

Zwrócono również uwagę na sieć kapilar trachealnych gęsto oplatających jelito. Posiewy poszczególnych części tych przewodów, zarówno stykających się z jelitem, jak i dalszych odcinków wykazały całkowitą ich jałowość. Jałowa również okazała się hemolimfa. Zarówno do posiewów trachealnych jak i hemolimfy używano podłoża agarowego z dodaniem pożywki Nr II.

IV. Własności fizjologiczne szczepu I₂.

Spośród 12 wyizolowanych szczepów bakteryjnych zbadano własności fizjologiczne jednego szczepu. Szczep ten tworzy na agarze kolonie białe, płaskie, krzewiaste, o brzegach mocno postrzępionych. Jest to ruchliwa pałeczka gramujemna, zarodnikująca, długości 5,5 μ i szerokości 0,9 μ . Czterodniowe kultury. tworzą łańcuszki z pięciu do sześciu pałeczek.

Wyizolowany szczep doskonale rozwijał się na kartoflu, a brak było wzrostu na marchwi. Już po 24 godz. rozpuszcza żelatynę.

W następnych doświadczeniach starano się ustalić stosunek wyizolowanego szczepu bakteryjnego do różnych związków azotowych.

Doświadczenie przeprowadzono w probówkach z 5 ml pożywki mineralnej o następującym składzie:

K_2HPO_4	—	0,05 g
KH_2PO_4	--	0,05 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0,05 g
NaCl	—	0,05 g
$CaCO_3$	—	0,01 g
wody wodociągowej	—	100 ml.

*) Na każde 100 ml podstawowej pożywki mineralnej dodawano tyle glukozy, aby zawartość węgla w pożywce wynosiła 1% oraz taką ilość związków azotowych, aby koncentracja azotu wynosiła 0,1%. Przy sporządzaniu pożywek z różnymi związkami azotu starano się, aby początkowe pH pożywek wynosiło 7,0. Szczepiono oczkiem platynowym, starając się za każdym razem pobrać jednakową ilość masy bakteryjnej. Inkubowano w temp. 35° przez 7 dni. Rozwój bakterii oceniano według zmętnienia pożywki przyjmując następującą skalę oceny: -- brak zmętnienia, 1/2 bardzo słabe, 1 słabe, 2 intensywne, 3 bardzo intensywne. Z każdym związkiem wykonano trzy równoległe próby. Wyniki doświadczenia zebrano w tabeli II.

Na siarczan amonu szczep ten w trzecim dniu tworzy na powierzchni pożywki kożuszek, który utrzymuje się do końca trwania doświadczenia. Przy podaniu jako źródła azotu peptonu razem z glukozą, siódmego dnia rozwoju na dnie próbki powstała warstwa osadu bakterii. Przy rozwoju na asparaginie z glukozą szóstego dnia powstał na powierzchni pożywki kożuszek. Siódmego dnia rozwoju stwierdzono grubą warstwę śluzowatego kożuszka koloru różowego na powierzchni, a na dnie próbki osad. Wzrost na samym peptonie bez glukozy charakteryzuje się utworzeniem kożuszka na powierzchni pożywki już trzeciego dnia inkubacji, czwartego dnia stał się jeszcze grubszy i w tym stanie utrzymał się do końca doświadczenia z tym jednak, że szóstego dnia był mocno opalizujący. Siódmego dnia na dnie próbki utworzyła się warstwa osadu. Przy podaniu asparaginy bez glukozy, czwartego dnia rozwoju utworzył się na powierzchni pożywki bardzo siaby kożuszek, który utrzymywał się do końca doświadczenia.

Spośród związków azotowych nieorganicznych może być używany siarczan amonu, zaś z organicznych azotowych najlepiej używany jest pepton. Azot zawarty w peptonie jest najlepiej asymilowany w pożywce nie zawierającej glukozy. W wypadku dodania do pożywki glukozy powstają kwasy.

V. Próby rozkładu wosku na drodze bakteryjnej.

Podjęto próby stwierdzenia, jaki jest stosunek wyizolowanych 12 szczepów bakteryjnych do wosku.

Do doświadczeń użyto wosk otrzymany z ekstrakcji najpierw alkoholowej na gorąco, a później eterowej woszczyny pszczelej. Nie była to prawdopodobnie substancja zupełnie czysta — jako ester mirycylopalmitynowy — bowiem jej punkt topnienia oznaczony wynosił 61° (zatem był o jeden stopień niższy od punktu topnienia wosku pszczelego jaki podaje Scott (16), ($62-70^{\circ}$)).

Początkowe doświadczenia wykonano na podłożu agarowym. Zastosowano pożywkę Nr II w ilości podanej w części metodycznej i do każdego 100 ml tak przygotowanego podłoża dodawano 2 g wosku.

Pożywkę wraz z woskiem ogrzewano mocno w aparacie Kocha i gwałtownie wstrząsając celem wytworzenia zawiesiny wosku rozlewano do probówek. pH przygotowanej pożywki wraz z woskiem wynosiło 7.0. Dobrze rozgrzane probówki mocno wstrząsano i wylewano na szalki. Zastygłe podłoże zakażano wyizolowanymi szczepami bakteryjnymi w ten sposób, że pobierano je oczkiem z podłoża stałego i smarowano nimi powierzchnię podłoża w postaci smugi. Inkubowano w temperaturze 25° .

Przeprowadzone w ten sposób doświadczenie dało wynik negatywny. Po dwutygodniowym przetrzymywaniu szalek w warunkach zabezpieczających podłoże przed wysychaniem, nie stwierdzono pod mikroskopem rozkładu kuleczek wosku tkwiących w podłożu, mimo, że dokoła nich znajdowały się skupienia bakterii.

Następnej serii doświadczeń dokonano w erlenmeyerkach pojemności 100 ml. Wlewano do nich pożywkę Nr II, jako 30% wodny roztwór, doprowadzając do pH 8,4 (pH jelita — Duspiva (6)), przy pomocy 0,5% Na_2CO_3 i do każdej erlenmeyerki zawierającej 20 ml pożywki płynnej dodawano 0,2 g wosku użytego w poprzednim doświadczeniu. Pożywkę z woskiem wyjaławiano trzykrotnie, sprawdzając każdorazowo zmiany pH. Po trzecim wyjałowieniu gorące erlenmeyerki z pożywką i woskiem wstrząsano i studzono jednocześnie w strumieniu zimnej wody celem utworzenia zawiesiny. Z każdym szczepem bakteryjnym wykonano trzy równoległe próby. Każdą równoległą serię erlenmeyerki zakażano jednym szczepem bakteryjnym, pobierając bakterie oczkiem platynowym z podłoża stałego. Zaszczepione erlenmeyerki inkubowano w temp. 25° .

W pierwszych dniach inkubacji stwierdzono intensywny rozwój bakterii. Po tygodniu, na powierzchni pożywki powstał kożuszek, który po dwóch tygodniach opadł na dno. Pożywka w niektórych erlenmeyerkach stała się klarowna. Ponieważ w ciągu czterech tygodni nie stwierdzono zmniejszania się ilości dodanego wosku, pozostawiono kultury w termostacie. Dopiero po upływie sześciu miesięcy, dziewięć szczepów bakteryjnych, wśród których znajdował się szczep I_2 , rozłożyło wosk zawarty w erlenmeyerkach. Ze wszystkich erlenmeyerok woda wyparowała. W tych erlenmeyerkach w których wosk nie został rozłożony oraz w kontrolnych widać było na dnie wosk w postaci grudek, natomiast w tych erlenmeyerkach, w których został rozłożony na dnie znajdowała się warstwa osadu.

Ponieważ w czasie wykonywania tej pracy ukazała się na ten sam temat praca Florkina, Lozeta i Sarleta (7) zaniechano ilościowych oznaczeń produktów rozkładu bakteryjnego wosku.

W doświadczeniach Florkina i współpracowników, rozkład wosku na ścianach probówek nastąpił po upływie pięciu tygodni. O wiele dłuższy okres czasu rozkładu wosku w doświadczeniach autora możnaby tłumaczyć nieodpowiednimi warunkami: temperatury, pH, wentylacji, gromadzeniem się metabolitów bakterii.

Po orientacyjnych próbach bakteryjnego rozkładu wosku zajęto się bliżej jednym szczepem oznaczonym I_2 , u którego już poprzednio określono stosunek do niektórych związków azotowych.

VI. Próby izolacji enzymu ze szczepu bakteryjnego I_2

Z kolei podjęto próby wyizolowania enzymów produkowanych przez szczep I_2 i zbadania ich działalności na wosk i błony komórek pszczelich jako dwóch zasadniczych składników woszczyny.

Na podstawie przedstawionych powyżej wyników możnaby wnioskować, że larwy mola woskowego pozbawione flory jelitowej i odżywiane jałową woszczyną, nie przyswajają podanego im pokarmu oraz, że flora jelitowa pełni prawdopodobnie jakąś pośrednią funkcję w trawieniu składników, zawartych w woszczynie zamieniając je na składniki przyswajalne przez larwę.

O ile to przypuszczenie jest słuszne, starano się stwierdzić działając wyciągiem enzymatycznym — otrzymanym ze szczepu bakteryjnego oznaczonego znakiem I_2 — na zasadnicze składniki wchodzące w skład woszczyny. Pod nazwą zasadniczych składników woszczyny

rozumiemy w tym przypadku czysty wosk i błony komórek pszczelich tworzących woszczyne.

Pierwsze próby polegały na zbadaniu struktury mikroskopowej błon. Do tego celu użyto kawałka woszczyzny pszczelej, w której przeszło rozwój jedno pokolenie czerwia pszczelego. Po ekstrakcji eterowej otrzymano „woszczyne“ pozbawioną substancji lipidowych, która zachowała swój pierwotny wygląd dzięki pozostaniu błon. Były one cienkie, koloru jasno żółtego. Obserwacje mikroskopowe drobnych kawałeczków błon pobranych z różnych miejsc komórki wykazały, że jest to substancja w której nawet przy zastosowaniu immersji nie widać żadnej struktury; zauważyć się dało tylko w wielu miejscach przylepione ziarenka pyłku oraz niekiedy włoski roślin. Ta błona intensywnie barwi się błękitem metylenowym i fuksyną karbolową i nie odbarwia się po długotrwałej kąpeli w alkoholu etylowym i wodzie. Jest dosyć odporna na działanie zasad, ulega hydrolizie dopiero po 8-godzinym działaniu na gorąco 1 n NaOH, dając ciemno brązowy roztwór o specyficznym zapachu.

W celu otrzymania wyciągu enzymatycznego ze szczepu bakteryjnego I₂, dokonywano posiewów tego szczepu w dużych płaskich kolbach — Soyki. Hodowano je na 1,5% podłożu agarowym z dodatkiem 30 ml pożywki Nr II, na każde 100 ml roztw. ag. Stosując tego rodzaju podłoże chodziło o to, aby otrzymać jak najwięcej wody kondensacyjnej, która ułatwiłaby zebranie z podłoża bakterii. Po dokonaniu posiewów, bakterie inkubowano przez dwie doby w temp. 35°. Bakterie splukiwano z podłoża wodą kondensacyjną, zlewano do naczynka wagowego i wstawiano do eksykatora na dnie którego znajdował się stężony kwas siarkowy. W celu przyspieszenia wyschnięcia bakterii i przeciwdziałania w wytworzeniu przez nie spor, usuwano z eksykatora powietrze przez wypompowanie go przy pomocy pompy próżniowej. W ten sposób, po upływie dwóch dni, otrzymywano suchą masę bakteryjną, z której można było dokonać wyciągu enzymatycznego.

Po wysuszeniu masy bakteryjnej oznaczano jej ciężar i do każdych 100 mg suchej masy bakteryjnej dodawano 4 ml chemicznie czystej gliceryny i 2,5 ml destylowanej wody jałowej. Suchą masę bakteryjną z roztworem wodnym gliceryny wstawiano na dobę do lodówki o temp. 0°. Po upływie doby naczynka wyjmowano z lodówki, łyżeczką rogową dokładnie mieszano zawartość (masę bakteryjną i roztwór gliceryny) i sączono przez filtr Schotta G 5, zachowując przy tym jak

najdalej posunięte środki ostrożności w zachowaniu jałowości preparatu.

Wodno glicerynowy wyciąg suchej masy bakteryjnej sączono pod zmniejszonym ciśnieniem przy użyciu pompy wodnej. Sączenie odbywało się bardzo powoli, a spływający do epruwetki wyciąg posiadał kolor brązowy. Przesącz przechowywano w lodówce w temp. 0°.

Otrzymany wyciąg enzymatyczny poddawano kontroli jałowości. Z każdej epruwetki zawierającej wyciąg pobierano jałową pipetą 0,5 ml wyciągu, rozlewano na szalki i zalewano agarem zawierającym pożywkę Nr II. Inkubowano w temp. 35°. Posiewów takich dokonywano zwykle cztery celem dokładniejszego stwierdzenia jałowości otrzymanego preparatu. Przetrzymanie szalek w termostacie w ciągu tygodnia wykazało kompletną jałowość otrzymanego preparatu.

W wypadku jednak, kiedy podłoże agarowe w kolbach Soyki zawierało mniej wody kondensacyjnej, a wyrosłe na nim dwudniowe kultury bakterii splukiwano jałową wodą destylowaną, czas suszenia bakterii w eksykatorze trwał kilka dni, a wytworzone w tym czasie spory przeszły do przesączu, co stwierdzono posiewami kontrolnymi. Przeto do doświadczeń dalszych, nie używano nawet najjnniejszej ilości otrzymanego wyciągu enzymatycznego, któryby uprzednio nie został poddany kontroli jałowości.

Wyniki oznaczeń potencjometrycznych pH wyciągu podane są w tabeli III.

Tabela III. — Table III.

Ciężar otrzymanej s. masy bakteryjnej The weight of the bacterial dry mass obtained	Ilość użytej		Kontrol. jał. wyciągu z 3 równoległych posiewów Control of sterility of 3 parall. seeds.	Wyniki pomiarów pH (3 równoległe oznaczenia) Results of measurements of pH (3 parall. determin.
	gliceryny glycerol	wody water		
mg	cm ³	cm ³		
0.1393	7.0	3.5	—	7.1
0.0408	2.0	1.0	—	7.2
0.1716	8.6	4.3	—	7.2
0.1525	7.6	3.8	—	7.2
0.1600	8.0	4.0	—	7.3
0.1528	7.6	3.8	+ x	—

— oznacza kompletną jałowość, + obecność bakterii w wyciągu.

*) tego wyciągu nie użyto do dalszych prób.

— denotes completely sterility, + presence of bacteria in the extract

*) this extract was not used + in subsequent tests.

W drugiej serii prób, przeprowadzono hodowlę bakterii w kolbach Soyki, z agarową pożywką Nr I bez glukozy. Postępowanie i warunki hodowli oraz sposób otrzymywania wyciągu był taki sam jak przy użyciu pożywki Nr II. Otrzymany wyciąg wodno-glicerynowy miał kolor jasno-żółty, jego pH wynosiło również 7,2, ale większość prób okazała się nie jałowa.

Druga seria doświadczeń polegała na tym, że hodowlę bakterii tego samego szczepu przeprowadzono w tych samych warunkach z tą jedynie różnicą, ażeby ilość wody kondensacyjnej, którą splukiwano bakterie z podłoża agarowego była jak najmniejsza. Przez szybkie wyparowanie w próżni małej ilości wody kondensacyjnej starano się otrzymać wysuszone formy wegetatywne bakterii przed wytworzeniem przez nie spor. Dalsze postępowanie z suchą masą bakteryjną było takie same jak w poprzednich próbach. Stosując ten sposób suszenia bakterii, udało się otrzymać pewną ilość jałowego wyciągu, który został użyty w następujących doświadczeniach.

Aby otrzymać możliwie najdrobniejsze grudki wosku postępowano w ten sposób, że 2 g czystego wosku zalewano 200 ml 96% alkoholu etylowego i ogrzewano na łaźni wodnej aż do zupełnego rozpuszczenia się. Do gorącego roztworu, wlewano duży nadmiar wody destylowanej z odrobiną NaCl. Wytrącony w ten sposób wosk tworzył bardzo drobną zawiesinę, którą sączono przez sączek z bibuły i przemywano wodą destylowaną. Powstały na sączku osad suszono w eksykatorze próżniowym nad kwasem siarkowym, a następnie przesiewano go przez gęsty woreczek jedwabny.

Z przygotowanym w ten sposób woskiem wykonano szereg doświadczeń w cylinderkach szklanych. Wodno-glicerynowy wyciąg enzymatyczny nie rozkładał wosku w tych warunkach doświadczenia. Negatywne wyniki otrzymano również po zastosowaniu roztworów buforowych (z fosforanów) od pH 7,4 do 8,0.

Jeżeli, mimo licznych prób i dużych usiłowań, nie osiągnięto dodatnich wyników, to przyczyną tego jak należy przypuszczać może być: hamujące działanie użytych w doświadczeniach buforów, brak odpowiednich aktywatorów, znacznie dokładniejsze warunki pH, temperatury, albo być może brak enzymu w używanym wyciągu. Wreszcie brak rozkładu wosku w próbkach można wytłumaczyć właściwością enzymu, którego działalność ściśle związana jest z działalnością żywej plazmy bakteryjnej.

Druga część pracy związana z badaniem działalności otrzymanego wyciągu enzymatycznego polegała na stwierdzeniu, jak będzie on działał na błony komórek pszczelich.

Pierwsze próby wykonano w pierścieniach szklanych przykrytych szkiełkami przykrywkowymi, na których w kropli wyciągu enzymatycznego znajdował się skrawek błony komórki pszczelej. Wykonano sześć równoległych prób, w których rozkład badano po 24-godzinnym prze-trzymaniu w termostacie w temp. 35°. Po upływie tego czasu stwierdzono obserwacją mikroskopową, że skrawki błon zostały w niektórych miejscach ponadżerane i potworzyły się wgłębienia.

Drugą serię doświadczeń przeprowadzono w tych samych warunkach z tą różnicą, że do kropli wyciągu z błoną dodawano eżą kroplę roztworu węglanu sodu, którego pH wynosiło 7,5. Preparaty trzymano w termostacie w tych samych warunkach temperatury. Po upływie doby, w czterech próbach stwierdzono mikroskopowo daieko posunięty rozkład błon, niektóre z nich były głęboko ponadżerane, w pozostałych zaś dwóch próbach błony uległy całkowitemu rozłożeniu.

Następne doświadczenia z wyciągiem enzymatycznym przeprowadzono w probówkach. Do sześciu jałowych probówek wkładano po 10 mg błon komórek pszczelich; do każdej z nich dolewano jałowo po 1 ml wyciągu glicerynowego i umieszczano w termostacie w temp. 35°. Po upływie doby, we wszystkich probówkach stwierdzono zanik błon. Posiewy kontrolne zawartości sześciu probówek, wykazały całkowitą jałowość pięciu probówek i po upływie tygodnia w temperaturze 35° brak było na szalkach wzrostu bakterii, podczas gdy posiewy dokonane z szóstej probówki już po upływie 24 godzin wykazały rozwój pewnej ilości kolonii bakteryjnych. Powtórna kontrola jałowości wyciągu znajdującego się w epruwetce — a który był użyty do doświadczeń wyżej opisanych — wykazała całkowitą jałowość wyciągu, zatem obecność w jednej probówce bakterii możnaby tłumaczyć wprowadzeniem spor wraz z błonami.

Ponieważ obserwacje mikroskopowe rozkładu błon komórek pszczelich pod działaniem wyciągu enzymatycznego w obecności roztworu węglanu sodu o $\text{pH} = 7,5$ wykazały, że rozkład w tych warunkach jest silniejszy, wykonano jeszcze jedną serię doświadczeń. W sześciu jałowych probówkach umieszczano po 20 mg błon, do których jałowo dodawano po 2 ml roztworu Na_2CO_3 o $\text{pH} = 7,5$ oraz do pięciu probówek po 0,5 ml wyciągu wodno-glicerynowego, szóstą zaś probówkę bez wy-

ciągu a tylko z węglanem sodu i błonami komórek pszczelich uważano za kontrolną. Całość umieszczano w termostacie w temp. 35°C.

Po 120 godzinach we wszystkich pięciu probówkach zawierających wyciąg enzymatyczny stwierdzono zupełny zanik błon komórek pszczelich — podczas gdy w kontrolnej pozostały w dalszym ciągu bez zmiany. Posiewy kontrolne zawartości probówek wykazały zupełną jałowość. Wynikałoby z tego, że rozkład błon komórek pszczelich został dokonany przy udziale enzymu otrzymanego z suchej masy bakteryjnej jaki został wprowadzony w roztworze wodno-glicerynowym. Na uwagę zasługuje tu fakt, że w ostatniej serii przeprowadzonych doświadczeń rozkład błon w probówkach z dodatkiem roztworu węglanu sodu o pH 7,5 trwał nieco dłużej, niż w doświadczeniach wykonanych wcześniej bez dodania roztworu węglanu sodu, a tylko z dodaniem samego wyciągu. Przypuszczać należy, że przyczyną tego może być zbyt mała ilość użytego w ostatnim doświadczeniu wyciągu wodno-glicerynowego, który jeszcze bardziej został rozcieńczony przez wprowadzenie 2 ml roztworu węglanu sodu, oraz większą ilością użytych do rozkładu błon komórek pszczelich. Być może również, że przedłużenia rozkładu błon należy dopatrywać się w nagromadzeniu w zbyt małej objętości roztworu produktów rozkładu enzymatycznego, które w tym wypadku mogą działać hamująco na przebieg dalszego rozkładu.

Zarówno z przesączeni wodno-glicerynowym jak i z przesączem wraz z produktami hydrolizy błon komórek pszczelich wykonano szereg prób jakościowych, na białko i cukry, które dały wynik negatywny.

Aczkolwiek wykonane próby jakościowe z wodno-glicerynowym wyciągiem enzymatycznym wypadły negatywnie, to jednak fakt, że błony komórek pszczelich ulegają rozkładowi w obecności tego wyciągu, oraz brak tego rozkładu w probówkach nie zawierających wyciągu wskazywałoby, że mamy tu do czynienia z mało dotychczas poznany, ale po raz pierwszy stwierdzonym zjawiskiem, że rozkład błon komórek pszczelich jest dokonany przez enzym czy też enzymy, produkowane przez wyizolowany z jelita larwy szczep bakteryjny.

Powtórzone te same doświadczenia z wyciągiem wodno-glicerynowym otrzymanym z bakterii wyhodowanych na peptonie z zachowaniem tych samych warunków temperatury, masy użytych błon do rozkładu, naczyń, pH i stosunków objętościowych wyciągów enzymatycznych i roztworu węglanu sodu. Wszystkie doświadczenia przeprowadzane z tym wyciągiem dały wynik negatywny — błony komórek pszczelich nie uległy rozkładowi. Wyniki tych doświadczeń zdają się

wskazywać, że w przesączu być może znajdował się enzym w stanie nieaktywnym. Możliwość istniałaby jeszcze taka, że w przesączu obecny był enzym czy też enzymy, które mogłyby działać na inny substrat, a nie działały na błony komórek pszczelich.

Jeżeli wodno-glicerynowy wyciąg z jednego szczepu bakteryjnego wyizolowanego z larwy mola zawiera enzym zdolny do rozkładu błon komórek woszczyzny pszczelej, to można by było przypuszczać, że wodno-glicerynowy wyciąg z jelita larwy powinien posiadać również te same zdolności rozkładowe.

Doświadczenie wykonano w ten sposób, że z dwunastu dorosłych larw mola wypreparowano jelita i wysuszono je w próżni nad kwasem siarkowym. Ciężar otrzymanej suchej masy jelit wynosił 0,1528 g., dodano do suchej masy jelit 7,6 ml chemicznie czystej gliceryny oraz 3,8 ml jałowej wody destylowanej i w ciągu 24 godzin trzymano w lodówce w temp. 0°, mieszając często zawartość naczynka łyżeczką rógową. Sączono pod zmniejszonym ciśnieniem przez filtr Schotta G 5. Otrzymaną ciecz ciemno brązową o pH = 6,8.

Wykonano próby rozkładu błon komórek woszczyzny pszczelej zarówno z samym wyciągiem jak i z dodatkiem roztworu węglańu sodu o pH = 7,5, w tych samych warunkach temperatury co i z wyciągiem otrzymanym ze szczepu bakteryjnego I₂. Wszystkie wykonane próby dały wynik negatywny — błony komórek woszczyzny pszczelej nie uległy rozkładowi.

VII. Dyskusja wyników

Przypuszczenia Dickmana (3), że flora jelitowa larw mola woskowego, pełni przynajmniej jakąś pośrednią funkcję w trawieniu wosku, w której mikroorganizmy biorące udział w rozkładzie tej substancji produkują substancje pośrednie przyswajane przez larwy, zostały częściowo potwierdzone w przeprowadzonych doświadczeniach, a w czasie wykonywania tej pracy i przez Florkina (7). Zarówno w pracy Florkina jak i tej pracy, rozkład wosku został dokonany in vitro przez wyizolowane szczepy bakteryjne, występujące w jelicie larw mola. Wyników tych doświadczeń w całej pełni nie możnaby przenieść na teren tkanki nabłonka jelitowego larw mola.

Jeżeli jednak rzeczywiście rozkład wosku w jelicie larwy mola jest przeprowadzany przez florę bakteryjną, to produkty hydrolizy wosku częściowo lub całkowicie muszą być zużywane w procesach życiowych

bakterii. Powstaje pytanie, jakie składniki są — przez bakteryjny rozkład wosku — uprzystępnione larwie? Czy jest to część składników powstałych przez rozkład bakteryjny wosku, czy też produkty metabolizmu bakterii? Na te pytania trudno jest dać w tej chwili odpowiedź z powodu braku bezpośrednich dowodów. Przenoszenie całkowicie wyników analiz — dokonanych przez Florkina — nad rozkładem bakteryjnym wosku *in vitro* na teren jelita larwy, byłoby błędem. Przebieg procesu rozkładu w jelicie dzięki działaniu zespołu bakterii a nie jednego szczepu musi być niewątpliwie inny. Ponadto substancja jaką użył do swoich doświadczeń Florkin nie była czystym woskiem, a frakcją lipidową woszczyny pszczelej, przeto wyliczenia jego będą słuszne w stosunku do tych założeń jakie poczynił.

Trudno jest w tej chwili zestawić wyniki badań nad zużyciem kwasów tłuszczowych przez larwę mola (Niemierko), z rezultatami prac nad zdolnością rozkładu i asymilowania produktów rozkładu wosku przez bakterie (Florkin), gdyż zarówno w jednej jak i drugiej pracy, mianem „wosku“ określa się substancję nie czysto chemiczną jako ester mirycylo-paimitynowy, a mieszaninę związków o charakterze lipidowym, którą w tej pracy oznaczano mianem frakcji lipidowej. W każdym bądź razie zarówno praca Florkina jak i wyniki doświadczeń otrzymane w tej pracy — przeprowadzone w tym samym czasie — potwierdzają, że wosk (znajdujący się we frakcji lipidowej) może być rozkładany przez bakterie jelitowe larw mola. Pozwala to przypuszczać, że podobne stosunki istnieją na terenie przewodu pokarmowego larwy mola.

Mogłoby to tłumaczyć negatywne wyniki doświadczeń wcześniejszych autorów (v. Pertzoff, Kraut i współpracownicy, Dupiva) poszukujących cerazy u larw mola.

Wszystko zdaje wskazywać na to, że larwy mola woskowego są prawdopodobnie pozbawione enzymu, zdolnego do rozkładu wosku, oraz że wosk jest rozkładany przez florę jelitową.

Pierwsze dodatnie wyniki w zakresie rozkładu wosku przez bakterie wyizolowane z jelita larw mola woskowego otrzymano we wrześniu 1948 roku. Pierwszy komunikat na ten temat wygłoszony został w roku 1949 (14) całą pracę na ten temat zreferowano w Towarzystwie Naukowym Warszawskim w listopadzie 1949 r. (15). Wyniki te zostały potwierdzone przez Florkina (7).

Woszczyna pszczela jako pokarm larw mola oprócz substancji o charakterze lipidowym, zawiera również produkty przemiany materii

czerwia pszczelego, w których między innymi znajdują się produkty przemiany azotowej.

Z doświadczeń przeprowadzonych przez Metalnikowa wynika, że źródłem azotu dla larw mola są błony woszczyny komórek czerwi pszczelich. Doświadczenia wykonane w tej pracy a przeprowadzone w hodowlach nie jałowych potwierdziły wyniki doświadczeń Metalnikowa.

Wyniki hodowli larw mola karmionych różną woszczyną stwierdzają, że larwy mola mogą się odżywiać woszczyną świeżo sporządzoną w której frakcja lipidowa przekracza 99% przy minimalnej zawartości azotu (0,09%). Odżywianie larw tym pokarmem cechuje ogromne zredukowanie procesów wzrostowych oraz duże straty w ilości larw hodowanych, które zostają pożarte przez inne. Najlepsze wyniki hodowli otrzymuje się przy karmieniu larw woszczyną starą — komórki robotnic. Na podstawie wyników otrzymanych w hodowli B, uważać należy, że czynnikiem decydującym o rozwoju i przebyciu normalnej metamorfozy są związki azotowe, których zawartość w podanym pokarmie gwarantuje pełny rozwój larw. Słuszne to jest tylko w odniesieniu do woszczyny a nie do wydaliny. W tym bowiem wypadku zawartość procentowa azotu prawie taka sama jak w woszczynie starej — komórkach robotnic nie daje tych samych wyników co hodowla na woszczynie starej. Siedmiokrotnie dłuższy czas trwająca hodowla larw karmionych wydaliny w porównaniu z kontrolną, przy obecności w podanym pokarmie prawie tej samej ilości azotu wskazuje, że azot tam zawarty występuje w związkach częściowo być może przyswajanych, a zapotrzebowanie na azot larwy pokrywają kosztem zjedzenia innych larw. Zmiana woszczyny spowodowana ekstrakcją wodną na gorąco pod ciśnieniem, ekstrakcją na zimno lugiem, kwasem i alkoholem połączona z destrukcją pokarmu, nie usuwa z pokarmu tych składników, które warunkują pełny rozwój larw. Ekstrakcja woszczyny nie usuwa składników azotowych przyswajanych przez larwy, czego dowodem jest mała ilość zjedzonych larw w hodowli E i F.

Związki azotowe, które larwa pobiera i przyswaja są odporne na działanie stosowanych w tej pracy czynników, a zmiany jakim one ulegają w czasie działania tymi czynnikami, nie są zmianami, które mogłyby wpływać na ich nieprzyswajanie. Trudno jest ustalić pochodzenie błon komórek woszczyny pszczeliej. Niewątpliwie są one ściśle związane z rozwojem czerwia pszczelego, bowiem ilość ich wzrasta w woszczynie

w zależności od ilości wyhodowanych w niej pokoleń czerwia. Jest to substancja bez widocznej struktury, i można by zdaje się uważać ją za wydzielinę gruczołów czerwia pszczelego. Przypuszczać dalej należy, na co brak jest w tej chwili dostatecznie pewnych dowodów eksperymentalnych, że musi to być substancja o charakterze białkowym. Być może, że zawiera ona i produkty przemiany azotowej czerwia pszczelego.

Brak błon w woszczynie świeżo sporządzonej powoduje zahamowanie procesów rozwojowych larw mola woskowego, a znaczne zmniejszenie liczebności hodowanych w poszczególnych kulturach larw wskazywałby, że inne larwy pożarte przez larwy pozostałe przy życiu były dla nich źródłem azotu.

Wzajemne pożeranie się larw mola stwierdzone po raz pierwszy przez Metalnikowa przy odżywianiu larw woskiem zostały potwierdzone i w tej pracy, nie tylko w czasie ich hodowli na woszczynie świeżo sporządzonej, która zawierała przeszło 99% związków lipidowych, ale i w innych przypadkach. Otrzymane wyniki hodowli larw w warunkach nie jałowych dały dostateczne dowody do wnioskowania, że wzajemne pożeranie się larw występuje zawsze wtedy, kiedy larwy odczuwają brak w podanym pokarmie związków azotowych. Zjawisko wzajemnego pożerania się larw wystąpiło bardzo jaskrawo przy karmieniu ich wydaliniami. Mimo nieznacznie większej zawartości azotu w wydalinach larw w porównaniu z oznaczoną ilością azotu w woszczynie starej — komórkach robotnic, pierwiastek ten występuje prawdopodobnie w wydalinach w takich związkach, które są albo w minimalnym stopniu albo wcale nieprzyswajalne przez larwy. Należałoby przypuszczać, że spożywane wraz z woszczyną pszczelą zawarte w niej związki azotowe (błony komórek czerwia pszczelego) ulegają rozłożeniu a zostają asymilowane tylko niektóre produkty hydrolizy. Pozostała zaś część związków azotowych, jako bezużyteczna zostaje wydalona.

Wyniki doświadczeń kontrolnych (100% poczwerek) prowadzonych w 6 kulturach z jednakową ilością jaj (30) oraz dużą ilością woszczyny (30 g w każdej kulturze) wskazują, że wzajemne pożeranie się larw jest objawem głodu azotowego.

O słuszności takiej interpretacji świadczą również wyniki doświadczeń przeprowadzonych nad rozwojem larw mola w warunkach jałowych. W tej serii doświadczeń wyniki otrzymane w tej pracy nie są zgodne z wynikami jakie otrzymał Wolman.

Wollman miał otrzymać sześć pokoleń jałowych larw mola, podczas kiedy w wyniku przeprowadzonych w tej pracy hodowli, otrzymano w każdej erlenmeyerce po jednej, czasem dwie poczwarki, z których poza jednym wypadkiem w ogóle nie wylęły się motyle. Jedyny wylęły motyl odznaczał się małymi rozmiarami w porównaniu z wielkością motyli jakie spotyka się przy karmieniu larw woszczyną nie jałową i w wypadku gdy larwy nie odczuwają niedostatku w pokarmie związków azotowych. Znalezione oprzędy w kulturach jałowych wewnątrz których znajdowały się poczwarki były bardzo cienkie. W pracy swej Wollman nie podaje ogólnej charakterystyki — w przeprowadzonych przez niego hodowlach jałowych — stadiów rozwojowych mola. Ogranicza się do podania temperatury w jakiej była wyjaławiana woszczyna pszczela i do liczby otrzymanych jałowych pokoleń. Trudno jest znaleźć przyczyny tak wielkiej rozbieżności wyników. Być może, rozbieżność ta powodowana była przez zastosowany sposób wyjaławiania użytej woszczyny. Wollman wyjaławiał woszczynę w temperaturze 120° , w pracy niniejszej wyjaławiano woszczynę w autoklawie przez 1,5 godz. pod ciśnieniem 2,5 atm. (137°). Z pracy Wollmana trudno jest się zorientować w jakich warunkach została wyjałowiona woszczyna, czy w parze wodnej czy w suchym powietrzu.

W pracy Wollmana brak jest również wzmianki na temat kontroli jałowości, przypuszczać jednak należy, że ten zasadniczy warunek kontroli został spełniony. Należy przewidywać, że dalsze prace jeżeli zostaną podjęte w celu prześledzenia zużycia przez larwy w warunkach jałowych poszczególnych składników, rozwiążą ten problem i wyjaśnią przyczyny różnych wyników otrzymanych przez Wollmana i autora tej pracy.

Małą ilość spożytego przez larwy pokarmu w warunkach jałowych tłumaczono przy omawianiu wyników tych doświadczeń niemożliwością przyswajania przez larwy składników zawartych w pokarmie

Wyniki pracy Florkina i wyniki tej pracy zdaje się dostarczają dostatecznych dowodów do wnioskowania, że rozkład tych składników jest udziałem bakterii jelitowych larw. Jaka część tych produktów jest zużywana przez larwy a jakie składniki przez bakterie, czy larwy mola przyswajają niektóre produkty bakteryjnego rozkładu wosku, czy też produkty metabolizmu bakterii nie wiadomo wobec braku oznaczeń ilościowych przemiany tłuszczowej w warunkach jałowych.

Rozkład błon komórek czerwia pszczelego przez wyciąg wodno-glicerynowy wysuszonych w próżni bakterii jelitowych pozwala wnio-

skować, że rozkład tego składnika w jelicie larwy mola jest prawdopodobnie również dokonany przez bakterie produkujące ten enzym. Ponieważ brak jest dostatecznych podstaw do przenoszenia wyników otrzymanych z działania wyciągu *in vitro* na teren jelita larwy, wskutek tego wnioski obejmujące tę część pracy wysuwane są nie w formie pewnej a w formie przypuszczeń. Można jednak, mając dotychczasowy wynik jakościowy działania wodno-glicerynowego wyciągu enzymatycznego na błony komórek czerwia pszczelego, łączyć go z wynikami hodowli larw mola: zarówno w warunkach nie jałowych jak i jałowych. Rozumowania przeprowadzone w oparciu o wyniki hodowli larw, będą dawały nieco mocniejszą podstawę do wnioskowania o roli mikroflory w procesach odżywiania larw mola.

W zakończeniu dyskusji wyników należy zwrócić uwagę jeszcze na jeden fakt, jaki miał miejsce zarówno w hodowlach nie jałowych, jak i jałowych larw. Już przy omawianiu wyników hodowli, w których larwy mola odżywiano ich wydaliniami, zwrócono uwagę, że czas jaki był potrzebny do ich zupełnego rozwoju licząc od chwili wylęgu z jaja aż do wylęgu motyla, wynosił w tych kulturach średnio 335 dni. W tych hodowlach otrzymano motyle bardzo małe, tak samo były małe poczwarki oraz cienkie oprzędę.

Jeżeli stanąć na stanowisku rozpatrywania procesów rozwojowych larwy bez jakiegokolwiek wpływu flory bakteryjnej, to zarówno przedłużony czas rozwoju larw, cienkie oprzędę, jak i wielkość otrzymanych motyli, możnaby tłumaczyć zarówno wpływem temperatury — który to czynnik niewątpliwie u tych zwierząt pełni doniosłą rolę ale nie wyłączną — wpływem pokarmu, jego jakości i wpływowi tych wszystkich innych czynników, które stanowią sumę czynników różniących rozwój w warunkach naturalnych od warunków eksperymentalnych. Nie można jednak zdaje się rozpatrywać tych procesów w oderwaniu od procesów mikrobiologicznych jakie mogą mieć miejsce na terenie jelita larwy. Stanowią one jeden z tych ważnych, a być może i najważniejszych w tym wypadku czynników, których pomijanie przy rozpatrywaniu procesów fizjologicznych larw mola, może być powodem niewłaściwej interpretacji tych procesów.

Rola mikroflory jelitowej larw mola nie ogranicza się jak przypuszczać należy tylko do funkcji rozkładu tych związków, które wchodziły w skład diety larw. Zarówno bowiem czas rozwoju jak i wielkość motyla otrzymanego w hodowli jałowej oraz brak motyli w innych kultu-

rach jałowych, może mieć jeszcze inne głębiej sięgające przyczyny a nie tylko niedostatek substancji azotowych lub niezdolność w tym wypadku rozkładania tych związków, których rozkład jest uwarunkowany florą bakteryjną. Znając zapotrzebowanie bakterii na składniki wzrostowe oraz ich zdolności do syntezy tych związków, możnaby przypuszczać, że obecność pewnego zespołu flory bakteryjnej w jelicie larwy może być tym czynnikiem, który nie tylko bierze udział w rozkładzie poszczególnych składników diety larwy, ale być może są one zdolne do syntezy tych witamin, które decydowałyby o przebiegu procesów rozwojowych larwy. Oczywiście przypuszczenia te nie oparte są na żadnych danych eksperymentalnych, a poruszane są w tym miejscu z tego względu, że zjawiska fizjologiczne należałoby rozpatrywać w ścisłej zależności jedne od drugich, aby tym sposobem nadać tym zjawiskom znacznie szerszą interpretację. Czynniki mikrobiologiczne najczęściej albo były pomijane albo dostatecznie niedoceniane w procesach fizjologicznych w dawniejszych pracach. Przy dzisiejszym stanie naszych wiadomości o roli jaką pełnią witaminy grupy B w rozwoju owadów można przewidywać, że być może i w procesach rozwojowych larw mola woskowego w warunkach jałowych mielibyśmy do czynienia z podobnym zjawiskiem.

Reasumując dyskusję wyników możnaby powiedzieć, że wyniki otrzymane zdają się wskazywać na całkowitą zależność procesów trawienia dwóch zasadniczych składników wchodzących w skład woszczyny pszczelej od flory bakteryjnej. W dalszych pracach nad odżywianiem larw mola, procesami jego rozwoju i metamorfozy, nie mogą i nie powinny być pomijane procesy mikrobiologiczne. Rozpatrywanie w tym wypadku zjawisk fizjologicznych — bez uwzględnienia strony mikrobiologicznej — może być powodem niewłaściwej ich interpretacji.

W n i o s k i

1. Larwy mola woskowego mogą odżywiać się woszczyną nie tylko starą, ale i świeżo sporządzoną.
2. Zjawisko pożerania się larw tłumaczone jest zapotrzebowaniem na związki azotowe.
3. Rozkład wosku *in vitro* dokonany przez bakterie wyizolowane z jelita larw mola pozwala przypuszczać, że i w jelicie larwy jest on również dokonywany przez bakterie.

4. Wodno-glicerynowy enzymatyczny wyciąg wysuszonego w próżni jednego szczepu bakteryjnego wyodrębnionego z jelita larwy, rozkłada błonę komórek czerwia pszczelego.

5. Wyniki hodowli jałowych wskazują na doniosłą rolę flory jelitowej w procesach trawienia woszczyny pszczelej.

Panu profesorowi dr. K. Bassalikowi uprzejmie dziękuję za pozwolenie wykonania pracy w Jego zakładzie, oraz za rady, wskazówki i dyskusje na temat pracy. Panu prof. dr. W. Kunickiemu jestem bardzo wdzięczny za cenne wskazówki i korektę pracy, mgr. St. Wislockiemu za wykonanie fotografii.

BIBLIOGRAFIA

1. Chibnall A. C., Piper S. H., Pollard A., Williams E. F., and Sahai P. N. — *Bioch. Journ.*, 28, 6, 1934.
2. Damoy — *J. Pharm. Chim.* 29, 148, 225, 1924.
3. Dickman A. — *Journ. of. Cell and Comp. Physiol.* 3, 2, 1933.
4. Dönhoff E. — *Arch. f. Anat. und Physiol., Physiol. Abt.* 1882.
5. Duspiva F. — *Zeitschr. f. vergl. Physiol.* 21, 4, 1934.
6. Duspiva F. — *Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg.* 21 (11), 1936.
7. Florkin M., Lozet F., Sarlet H. — *Arch. Intern. de Physiol.* Vol. LVII, 1949.
8. Gascard, Damoy — *Comp. Rend. Acad. Sc.* 177, 1224, 1442, 1923.
9. Jaubert G. F. — *Comp. Rend.* 185, 1927.
10. Kraut H., Burger H., v. Pantschenko-Jurewicz W. — *Bioch. Zeitschr.* 269, 1934.
11. Metalnikow S. — *Arch. de Zool. Exper. et Génér* IV Série, t. VIII, 1908.
12. Niemierko W. — XVII Intern. Physiol. Congress Oxford. *Abst. of Com.*, 1947.
13. v. Pertzoff — *Comp. Rend. Acad. Sc.* 187, 253, 1928.
14. Rybicki M. — *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia.* Rok II. Nr 2, 1950.
15. Rybicki M. — *Rocznik Towarzystwa Naukowego Warszawskiego* XLII, 1949.
16. Scott W. W. — *Standard methods of chemical analysis* Fifth edition. New York, 1939.
17. Tischer J. — *H. S. Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 267, 1940.
18. Wollman E. — *Arch. Intern. de Physiol.* 18, 1921.

Р Е З Ю М Е

Опыты проводились на личинках восковой моли. Целью этих экспериментов было установить, какое значение для личинок имеет флора кишечника.

Культуры не стерильные. Температура 25 — 27°C, влажность 70—80%.

Личинки восковой моли питались с момента вылупления из яиц разным пчелиным воском известного химического состава (см. табл. 1), своими собственными испражнениями (культура D), химический состав которых тоже был известен (см. текст стр. 27), а также старым воском (пчелиные ячейки) после экстрагирования водой в горячем состоянии (в автоклаве в течение 1,5 час., под давлением 2,5 атм.) (Культура E), после водной экстракции, 24-х часовая холодная ванна в 10% NaOH 24-х часовая холодная ванна в 10% HCl, и 24-х часовая холодная ванна в 96% этиловом спирте (культура F).

К у л ь т у р а А.

Автором установлено, что личинки восковой моли, кормленные воском только что приготовленным пчелами, питались этим кормом в течение 377 дней, достигая 12 мг веса (культурирование не доведено до конца вследствие повреждения термостата). Процессы развития и роста оказались в этой культуре сильно редуцированными. В этой культуре имели место большие потери среди личинок, вызванные взаимным друг друга съеданием.

К у л ь т у р а В (контрольная).

Самые лучшие результаты получены в культуре, в которой личинки восковой моли питались старым воском — (пчелиные ячейки) что подтверждает результаты полученные М е т а л ь н и к о в ым (11). В этих культурах взаимное съедание среди личинок имеет место лишь тогда, когда у личинок недостаточное количество пищи, состоящей из соединений азота.

Культура С.

Личинки кормятся старым воском — ячейки трутней. Их развитие протекает нормально. Они съедают определенное количество предназначенной для них пищи несколько быстрее в сравнении со скоростью потребления того же количества пищи в культуре В (контрольной). Это, повидимому, стоит в связи с меньшим содержанием в предназначенной для них пищи азотистых соединений.

Культура Д.

Личинки моли питались своими собственными испражнениями. Полный цикл развития вплоть до образования насекомого продолжается 335 дней. Малые экземпляры *imago*, долгий период развития (контрольные культуры В — в среднем 48 дней) и большое количество личинок съеденных другими личинками, указывают на отсутствие в испражнениях соединений азота усваиваемых личинками.

Культуры Е и Ф.

Результаты культивирования личинок, питаемых измененным воском (см. в тексте культуры Е и Ф) показывают, что при таком кормлении личинки развиваются нормально, но время их развития дольше контрольных (культуры В) о 20 дней.

Стерильные культуры — Температура 35°C
влажность 70 — 80%.

Личинки моли питались старым воском — пчелиные ячейки который подвергся стерилизации в автоклаве в течение 1,5 час под давлением 2,5 атм. (стерильные культуры А), а также 40%-ым H_2O_2 в течение 2 часов (стерильные культуры В). Перед началом культивирования, а также и во время культивирования проверялась стерильность воска и испражнений с помощью контрольных посевов на агаре при употреблении среды Про 1 Яйца моли (лучше развитые) подвергались стерилизации 1%-ой бромовой водой в течение 3 минут.

Стерильные культуры А.

В этих культурах установлено, что полный цикл развития личинок продолжается 97 дней. В каждой культуре (велись 4 параллельные культуры) находилось 7 г стерильного воска и 30 личинок. В начальных фазах развития личинки питаются в застывшем на дне липидном слое (фот. 1 и 2).

Со всего поданного количества воска личинками было потреблено от 1,8 г до 0,75 г. Результаты: в одной культуре одна моль, в двух культурах по одной куколке и в одной культуре две куколки (фот. 3 и 4), из которых не вылупились восковые моли. Во всех культурах личинки были съеданы теми личинками, которые смогли достигнуть своего полного развития. На основании полученных результатов можно прийти к заключению, что, по видимому, личинки моли, лишенные бактериальной флоры, не усваивают поданной им пищи.

Стерильные культуры. В.

Отдельные стерильные личинки, кормленные воском, стерилизованным 40%-ым H_2O_2 несмотря на то, что они этот воск потребляли гибли спустя 5—6 дней. Малые, нестерильные личинки, весом в 15—20 мг. кормленные этим же воском, потребляли его, а взвешенные сейчас после потребления воска весили от 40 до 52 мг. Эти результаты подтверждают предположение, что личинки восковой моли, лишенные флоры кишечника, не усваивают потребляемой ими стерильной пищи.

Бактериальная флора личинок моли.

Автор выделил из кишечника личинок моли 12 бактериальных штаммов, которые лучше всего развивались на агарном субстрате с добавлением 30% крепкого личиночного экстракта. Из 12 обособленных штаммов, девять штаммов в продолжение шести месяцев разложило в колбах Эрленмейра при температуре 25°C при применении среды Нро II— 0,2 г воска. Первый доклад о разложении микроорганизмами воска был сделан на X Съезде Польских Микробиологов в Сопоте в сентябре 1948 года (14, 15). В виду того, что аналогичные результаты в этом же году опубликовал Флоркин (8), результаты опубликованные Флоркиным и полученные автором следовало бы считать опубликованными одновременно.

Автор описывает свойства одного бактериального штамма, обозначенного I₂. Этот штамм образует белые, плоские кустообразные, с сильно изрезанных краях колонки. Это очень подвижная, *Gram.* отрицательная, спорообразующая палочка, длиной в 5,6 м и шириной в 0,9 м. Четырехдневные культуры образуют цепочки, состоящие из 5 до 6 палочек. Эта форма обладает способностью усваивать азот неорганического проис-

хождения поданный в виде сернокислого аммония; из азотистых соединений органического происхождения лучше всего усваиваются пептоны.

Штамм 1/2 разводился в больших количествах на агарном субстрате с добавлением среды Нро II. Обмытые конденсированной водой бактерии подвергались высушиванию в вакууме серной кислотой, а затем приготавлился из сухой бактериальной массы водно-глицериновый экстракт (Таб. III), который фильтровался через фильтр Шотта G₅. рН водно-глицеринового экстракта из сухой бактериальной массы штамма 1/2 равнялся 7,2. Этот экстракт не обладал способностью гидролиза воска, но гидролизировал оболочки ячеек пчелиных личинок. Гидролиз оболочек протекает гораздо интенсивнее если к раствору добавить Na₂CO₃ с рН — 7,5.

В течение 120 часов 0,5 см³ водно-глицеринового энантатического экстракта после добавления к нему 2 см³ раствора Na₂CO₃ с рН — 7,5 при температуре 35°C способно разложить 20 мг оболочек пчелиных ячеек.

Химический состав субстанции оболочек пчелиных ячеек неизвестен. Эту субстанцию в проведенных анализах пчелиного воска автор называет сухой субстанцией (Табл. I). Так как количество этой субстанции возрастает в ячейках пчелиного сота (воска) в зависимости от того, сколько поколений пчел в них выросло, следует думать, что это продукт, который должен иметь какую то связь с циклом развития пчел. Под микроскопом не обнаружено никакой структуры; на оболочках выступает некоторое количество цветочной пыльцы и волосков растительного происхождения. Оболочки легко красятся метиленовой синью, и карболовым фуксином. Не обесцвечиваются в этиловом спирте и в воде.

Результаты стерильных культур, разложение воска *in vitro* бактериями, выделенными из кишечника личинки, а также разложение оболочек пчелиных ячеек водно-глицериновым экстрактом, полученным из высушенных бактерий одного штамма, выделенного из кишечника, подтверждает предположение, что флора кишечника играет очень важную роль в процессах питания личинок восковой моли.

Объяснение употребления среды на стр. 39.

*На каждые 100 см³ основной минеральной среды добавлялось столько глюкозы, чтобы содержание угла в среде равнялось 10%, и такое количество азотистых соединений, чтобы концентрация азота составляла 0,1%. Приготавливая среды с различными соединениями азота, автор заботился о том, чтобы начальное рН сред равнялось 7,0. Посевы автор делал с помощью платиновой палочки стремясь каждый раз брать одинаковое количество бактериальной массы. Инкубация при температуре 35°C в течение 7 дней. Развитие бактерий оценивалось по интенсивности помутнения среды, принимая следующую шкалу оценок: — отсутствие помутнения, 1/2—очень слабое помутнение, 1—слабое, 2—интенсивное, 3—очень интенсивное.

В ы в о д ы

1. Личинки восковой моли могут питаться воском не только старым, но и только что приготовленным.

2. Явление съедания личинок друг другом объясняется потребностью азотистых соединений.

3. Разложение воска *in vitro* бактериями, выделенными из кишок личинок восковой моли допускает предположение, что и в самих кишках личинки он тоже разлагается бактериями.

4. Энзиматический водно-глицериновый экстракт, полученный из высушенного в вакууме одного бактериального штамма, выделенного из кишечника, разлагает оболочки пчелиных ячеек.

5. Результаты стерильных культур указывают на очень важную роль кишечной флоры в процессах пищеварения пчелиного воска.

S U M M A R Y

Experiments with the larvae of *Galleria mellonella* L. were conducted in order to investigate the role of the intestinal flora played in the larva.

Cultures not sterile. Temperature 25—27°C.,
humidity 70—80%.

Larvae of *Galleria mellonella* were fed from the moment of their hatching with various bees-wax of a known chemical composition (see table 1), with their own excrements (cultures D) of a known chemical composition (see the text page 27) and with old wax-cells of workers after hot aqueous extraction (autoclaved at 2,5 atm. for 1.5 hours) (culture E); after aqueous extraction, cold bath in 10% NaOH for 24 hours, cold bath in 10% HCl for 24 hours and cold bath in 96% ethylic alcohol for 24 hours (culture F).

Cultures A.

It was found, that the larvae of *Galleria mellonella* L. fed on wax freshly prepared by bees, took the food for 377 days, reaching the weight 12 mg. (the culture was not continued to the final stage). The processes of growth and development were in the culture greatly reduced. There were large losses in the culture caused by the mutual devouring of the larvae.

Cultures B (controls).

The best results were obtained in cultures, on which the larvae of *Galleria mellonella* L. were fed with old bees-wax-cells of workers, what confirms the results of Metalnikow's (11) experiments. In these cultures mutual devouring of larvae takes place in cases, when larvae are not supplied with sufficient amount of nitrogenous food.

Cultures C.

Larvae fed on old wax-cells of drones, undergo their development normally, take the determined amount of food somewhat quicker in comparison with the speed of taking the same amount of food in the culture B. This should be linked with the smaller content of nitrogenous compounds in the given food.

Cultures D.

The larvae of *Galleria mellonella* L. fed on their own excrements undergo their full development up to the hatching of the butterfly in 335 days. Small exemplaries of imago, the long developmental time (control cultures B — average 48 days) and the large number of larvae devoured by others indicate the lack in the excrements of nitrogenous compounds assimilated by larvae.

Cultures E and F.

Results of cultivation of larvae fed on changed wax indicate, that larvae taking this food undergo their development normally, but only the time of their development is 20 days longer, than in the controls (cultures B).

Sterile cultures. Temperature 35°C.,
humidity 70—80%.

Larvae of *Galleria mellonella* L. were fed on old wax-cells of workers, which was sterilized in an autoclave at 2,5 atm. pressure for 1,5 hours (sterile cultures A), and 40% H₂O₂ for two hours (sterile cultures B). Before the beginning and during the cultivation the sterility of the wax and excrements was controlled by control inoculations on agar using medium Nr I. (methodic part). Eggs of *Galleria mellonella* L. (advanced in their development) were sterilized using 1% bromine water for 3 minutes.

Sterile cultures A.

In these cultures it was found, that the larvae underwent their full development in the course of 97 days. In each culture, four of which were parallelly set—there was 7 g. of sterile wax and 30 larvae. In the initial developmental stadia the larvae fed on the coagulated on the bottom lipid layer (phot. Nr 1 and Nr 2). Out of the total amount of the given wax the larvae used in the separate cultures from 0,75 to 1,8 g. The result of cultivation was in one culture one butterfly, in two cultures one pupa in each of them and in one culture 2 pupae (phot. Nr 3 and Nr 4) from which no butterflies hatched. Individuals, which reached at least the pupa stadium devoured during the cultivation the remaining larvae, what most probably enabled them their development. The results of these cultivations permit to draw tentative conclusions, that most probably larvae of *Galleria mellonella* deprived of bacterial flora do not assimilate the given food.

Sterile cultures B.

The separate sterile larvae fed on wax sterilized in 40% H_2O_2 — in spite of the devouring-died after five to six days. Small larvae, not sterilized, of a weight 15—20 mg. fed on the same wax devoured and weighted after the consuming of the wax 40—52 mg. The results of these experiments confirm suppositions, that the larvae of *Galleria mellonella* L. deprived of intestinal flora do not assimilate the consumed sterile food.

Bacterial flora of larvae of *Galleria mellonella* L.

From the intestine of larvae of *Galleria mellonella* L. 12 bacterial strains were isolated, which grew most readily on agar medium with addition of 30% of extract of larvae (the mode of preparation of the extract see methodical part). Out of the total number of 12 isolated strains, 9 strains after 6 months decomposed the total amount (0,2 g) of the given wax in Erlenmeyer's flasks at 25°C. and using medium Nr II. The first report on the decomposition of wax by bacteria was announced before the X Meeting of the Polish Microbiologists in Sopot in September, 1949 (14, 15).

Because in the same year similar results were published by Florkin (8), therefore Florkin's and our results should be regarded as results published simultaneously.

The properties of one bacterial strain, classified as I_2 were closer investigated. This organism forms white colonies, flat, bushy with strongly crenated edges. It is a motile bacterium, Gram negative, sporing, measuring 5,5—0,9 μ . Four days old cultures produce chains, consisting of 5—6 bacteria. This strain is characterized by the ability to assimilate nitrogen of inorganic origin, given in the form of ammonium sulphate; of organic nitrogenous compounds pepton is most used.

Strain I_2 was cultivated in large amounts on agar with medium Nr II. Bacteria washed with condensation water were dried in vacuum above sulphuric acid and from the dry bacterial substance an aqueous-glycerol extract was prepared (table III), which was filtered through Schott's G. 5. filter paper. The aqueous-glycerol extract of the dry bacterial mass of the strain I_2 was characterized by pH 7,2, did not hydrolyze wax, but hydrolyzed membranes of bees-larvae cells. The hydrolysis of membranes run more intensively after the addition to

the solution of Na_2CO_3 of pH — 7,5. In the course of 120 hours 0,5 ml. aqueous-glycerol enzymatic extract with the addition of 2 ml. solution of Na_2CO_3 of pH 7,5 at 35°C. decomposes 20 mg. of bees-cells membranes.

Membranes of bees-cells are a substance of an unknown chemical composition, containing nitrogen, which on table I. illustrating the result of chemical analysis of bees-wax is marked as the dry substance. Since the amount of the substance increases in the cells of the bee honey comb (wax), depending on the number of generations of bees-larvae, which underwent in it their development, it should be concluded, that it is a product, which remains in some relation with the development of bees-larvae. Microscopical investigations revealed no definite structure; on the membranes there is a certain amount of flower-pollen and hair of plant origin. The membranes are easily stained with methylen-blue and carbolic fuchsin, and are not destained by ethylic alcohol and by water.

The result of sterile cultures, the decomposition of wax in vitro by bacteria, isolated from the intestine of the larva and the decomposition of membranes of bees-cells by aqueous-glycerol extract of dry bacteria of one strain isolated from the intestine confirm suppositions, that the intestinal flora plays an important role in the processes of assimilation of the larva of *Galleria mellonella* L.

RECEPT TO USE THE MEDIUM OF THE PAGE 39

To each 100 ml. of the basic mineral medium such quantity of glucose was added as to make the content of carbon in the medium reach 1% and such quantity of nitrogenous compounds, as to make the concentration of nitrogen reach 0,1%. In the course of the preparation of media with various nitrogenous compounds attempts were made to maintain at the beginning the pH of the medium 7,0. Inoculations were made by means of a platinum loop, whereby care was taken to transfer each time an equal amount of the bacterial mass. Incubation at 35°C for 7 days. The growth of bacteria was estimated on the basis of the degree of the turbidity of the medium and the following scale of evaluation was accepted—lack of turbidity, 1/2 very slight, 1 slight, 2 intensive, 3 very intensive. With each compound three parallel tests were performed. Results of the experiments are summarized on the table II.

Conclusions

1. Larvae of *Galleria mellonella* L. can assimilate not only old wax, but also a freshly prepared one.
2. The phenomenon of mutual devouring of larvae by the larvae is explained by the requirement of nitrogen-compounds.
3. The decomposition of wax in vitro performed by bacteria isolated from the intestine of larvae of *Galleria mellonella* L. permits to suppose, that also on the terrain of the intestine of the larva it is accomplished by the bacteria.
4. Aqueous-glycerol enzymatic extract of dried in vacuum one bacterial strain, isolated from the intestine, decomposes membranes of the cells of bees-larvae.
5. Results of sterile cultivation are in indication of the important role of intestinal flora in the processes of digestion of bees-wax.

OBJASNIENIE TABLICY

- Fot. 1. Dno kolbki z wydrążonymi przez larwy korytarzami w zakrzepłej warstwie lipidowej (wielkość naturalna).
- Fot. 2. Fragment dna kolbki z fotografii pierwszej w powiększeniu (powiększenie trzykrotne).
- Fot. 3. Zdjęcie z góry przez szyjkę kolbki z widocznymi na dnie dwoma oprzędami (wielkość naturalna).
- Fot. 4. Zdjęcie z góry przez szyjkę kolbki z motylem na dnie (wielkość naturalna).

Объяснение фотографии

- Фот. 1. Дно колбочки с выдолбленными личинками корридорами в застывшем липидном слое.
- Фот. 2. Увеличенная часть dna колбочки первого снимка (троекратное увеличение).
- Фот. 3. Снимок сверху через горлышко колбki с видными на дне двумя коконами.
- Фот. 4. Снимок сверху через горлышко колбki с восковой молью на дне.

EXPLANATION OF PLATE

- Phot. 1. The bottom of the flask with corridors grooved by the larvae in the coagulated lipid layer.
- Phot. 2. Fragment of the bottom of the flask in phot. 1 (magnified 3x).
- Phot. 3. The picture taken from the top, as seen through the neck of the flask. Two cocoons can be seen on the bottom.
- Phot. 4. A picture taken from the top of the flask through its neck — a butterfly on the bottom.



